

Université de Montréal

Étude anatomique de la relation entre les neurones exprimant l'hormone de relâche
des gonadotrophines et le nerf terminal lors du développement postnatal de l'opossum
(*Monodelphis domestica*)

par Naussicca Lakena Hour

Département de sciences biologiques
Faculté des arts et des sciences

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de Maître ès Sciences (M.Sc.)

Janvier 2017

© Naussicca Lakena Hour 2017

Résumé

Quoique très immature à la naissance, l'opossum grimpe de l'orifice urogénital de la mère jusqu'à une tétine à laquelle il s'accroche pour poursuivre sa maturation. Des informations sensorielles sont nécessaires pour que l'animal atteigne la tétine et que le réflexe d'attachement soit déclenché. Une modalité sensorielle envisagée est l'olfaction. Or, des expériences physiologiques effectuées au laboratoire sur des préparations *in vitro* suggèrent que le système olfactif central est trop immature pour influencer les comportements moteurs. Une étude immunohistochimique employant un marqueur de maturité axonique (NF200) a montré une absence de marquage dans le cerveau antérieur, à l'exception d'un mince faisceau reliant les bulbes olfactifs aux régions caudales du cerveau. L'implication de l'olfaction dans les comportements du nouveau-né est donc peu probable, mais la présence de ce faisceau est intrigante et l'étude de son développement est approfondie dans le présent travail. Le développement du faisceau exprimant NF200 est décrit de la naissance jusqu'à la fin de la 2^e semaine postnatale, âge auquel le marquage NF200 n'est plus observé à ce niveau. Il est aussi montré que le trajet de ce faisceau se superpose à celui de fibres nerveuses exprimant GnRH1, une neurohormone exprimée par des neurones hypothalamiques chez l'adulte. Les résultats indiquent que ce faisceau est le nerf terminal et pourrait servir de voie pionnière pour la croissance des fibres GnRH1. Aucun marquage NF200 dans le cortex olfactif n'est observé avant P15, supportant l'idée que le système olfactif n'influence pas les comportements de l'opossum nouveau-né.

Mots clés : GnRH1, nerf terminal, NF200, opossum, système olfactif

Abstract

While quite immature at birth, the opossum is nevertheless able to crawl from the urogenital opening to a mother's nipple to which it attaches to pursue its development. Sensory information are required to guide the newborn to the nipple and induce attachment. Olfaction is one of the sensory modalities often proposed. However, recent physiological experiments in the laboratory using in vitro preparations suggest that the olfactory system is too immature to influence the newborn behaviors. Furthermore, an immunohistochemical study using a marker of axonal maturity (neurofilament 200kDa, NF200) has shown that the prosencephalon is nearly devoid of mature fibers except for a thin fascicle running from the olfactory bulbs to more caudal areas of the brain. Olfaction is thus unlikely to guide the locomotion of the newborn, but the presence of this fascicle is intriguing and its development is studied in the present thesis. This fascicle is described from the day of birth to the end of the second postnatal week, when NF200 labeling is no more visible in this region. It is also shown that this fascicle superpose with fibers expressing GnRH1, a neurohormone characterizing hypothalamic neurons in the adult. The results indicate that this fascicle is the terminal nerve, and might serve as a pioneer pathway to GnRH1 fibers cells. Until P15, the olfactory cortex was devoid of NF200 projections, supporting that the olfactory systems is too immature to influence the behavior of newborn opossums.

Key words : GnRH1, Terminal nerve, NF200, Opossum, Olfactory system

Table des matières

Résumé	ii
Abstract.....	iii
Liste des figures.....	vi
Liste des tableaux.....	viii
Abréviations utilisées.....	ix
Remerciements	xi
1. Introduction générale	1
1.1. Le modèle, l'opossum <i>Monodelphis domestica</i>	4
1.1.1. Morphologie à la naissance.....	4
1.1.2. Comportements précoces du nouveau-né	5
1.1.3. Sens pouvant influencer les comportements précoces	6
1.2. Système olfactif	8
1.2.1 Développement du système olfactif chez les mammifères.....	12
1.2.1.1. Développement du système olfactif chez les euthériens	12
1.2.1.2. Développement du système olfactif chez les marsupiaux	13
1.2.1.3. Développement du système olfactif chez l'opossum	17
1.3. Le nerf terminal.....	20
1.4. GnRH.....	23
1.4.1. Caractérisation du GnRH.....	23
1.4.2. Localisation des neurones GnRH	24
1.4.3. Migration des neurones GnRH.....	27
1.5. Problématique.....	29
2. Matériel et méthodes.....	31
2.1. Animal.....	31
2.2. Préparation des spécimens	31
2.3. Immunohistochimie.....	32
3. Résultats	35
3.1 Marquage NF200 associé aux faisceaux de fibres précoces	35
3.2 Marquage GnRH1 associé au faisceau de fibres précoces	36
3.3 Cellules exprimant la GnRH1	40

3.4 Expression du GnRH1 dans des glandes nasales	42
3.5 Régions olfactives	44
4. Discussion & conclusion	46
Bibliographie	54

Liste des figures

Figure 1 : Coupes parasagittales d'un cerveau de nouveau-né d'opossum illustrant, en vert, le faisceau qui relie la partie ventrocaudale des bulbes olfactifs à la lame terminale.....	3
Figure 2 : Opossum <i>Monodelphis domestica</i> au jour de la naissance.....	4
Figure 3 : Schéma des voies centrales majeures du système olfactif principal et du système olfactif accessoire sur une vue ventrale du cerveau de souris adulte.....	9
Figure 4 :Schéma d'une coupe parasagittale d'une tête d'opossum illustrant la position de l'organe voméronasal, de l'épithélium olfactif et de leurs connexions au bulbe olfactif principal et au bulbe olfactif accessoire	10
Figure 5 : Stade du développement du rhinarium chez les marsupiaux néonataux...	14
Figure 6 : Diagramme sagittal du cerveau antérieur de l'opossum adulte.....	26
Figure 7 : Coupes adjacentes de cerveau d'opossum nouveau-né traitées avec les anticorps secondaires et soit l'anticorps primaire anti-NF200, soit l'anticorps primaire anti-GnRH1.....	34
Figure 8 : Coupes transverses de têtes d'opossum à P0, P2, P6 et P1.....	37
Figure 9 : Coupes transverses de têtes d'opossum illustrant le marquage NF200 et GnRH1 à différents âges.....	38
Figure 10 : Coupes transverses de cerveau d'opossums à P6 et P15 montrant le marquage GnRH1, NF200 et les deux marquages superposés dans les régions optiques.....	39
Figure 11 : Coupes transverses de têtes d'opossum montrant le marquage GnRH1 au niveau du VNO et du septum nasal à P6 ainsi qu'au niveau de l'éminence médiale à P6 et P11.....	40
Figure 12 : Coupes transverses au niveau du septum nasal d'opossums à P6 et P15 montrant des corps cellulaires exprimant la GnRH1	41
Figure 13 : Coupes transverses de la cavité nasale à P15 montrant les glandes exprimant la GnRH1 dans le méat inférieur nasal	43
Figure 14 : Coupes transverses à P6 et P11 montrant les fibres exprimant le NF200 dans les régions olfactives	44

Figure 15 : Coupes transverses montrant le marquage NF200 dans une portion du cortex olfactif à différents âges (P6, P11, P15)	45
---	----

Liste des tableaux

Tableau I : Décours temporel du développement des voies centrales olfactives chez le wallaby tammar, l'opossum et le rat.....	16
--	----

Abréviations utilisées

3V	troisième ventricule
AC	commissure antérieure / anterior commissure
aLA	amygdale antérieure latérale / anterior lateral amygdala
Am	complexe amygdalien
aMA	amygdale antérieure médiale / anterior medial amygdala
AOB	bulbe olfactif accessoire / accessory olfactory bulb
AON	noyau olfactif antérieur / anterior olfactory nucleus
AOT	tractus olfactif accessoire / accessory olfactory tract
BST	noyau du lit de la strie terminale / bed nucleus of the stria terminalis
DB	bande diagonale de Broca / diagonal band of Broca
E(#)	jour embryonnaire #
EC	cortex entorhinal / entorhinal cortex
GFAP	protéine acide fibrillaire gliale / glial fibrillary acidic protein
GnRH	hormone de relâche des gonadotrophines / gonadotrophin-releasing hormone
HC	hippocampe / hippocampus
hi	hippocampe présumé
HTH	hypothalamus
hy	régions hypothalamiques / hypothalamic areas
InFM	méat inférieur nasal / inferior meatus
LF	repli des lèvres / lip fold
LOT/lo	tractus olfactif latéral / lateral olfactory tract
Lter	lamme terminale / <i>lamina terminus</i>
ME	éminence médiale / medial eminence
MOB	bulbe olfactif principal / main olfactory bulb
MOE	épithélium olfactif principal / main olfactory epithelium
MSN	noyau septal médian / medial septal nucleus
N	narine
nAOT	noyau du tractus olfactif accessoire / nucleus of the accessory olfactory

	tract
NF200	neurofilament 200 kDa
nLOT	noyau du tractus olfactif latéral / nucleus of the lateral olfactory tract
nsp	septum nasal / nasal septum
OB	bulbe olfactif / olfactory bulb
OE	épithélium olfactif / olfactory epithelium
OMP	protéine marqueur de l'olfaction / olfactory marker protein
OpCh	chiasma optique / optic chiasma
OpT	tractus optique / optic tract
OT	tubercule olfactif / olfactory tubercle
P(#)	jour postnatal #
PC/Pir	cortex piriforme / piriform cortex
pLA	amygdale postérieur latéral / posterior lateral amygdala
pMA	amygdale postérieur médial / posterior medial amygdala
sfo	organe subfornical / subfornical organ
SM	sulcus medianus
spt	régions septales présomptives / presumptive septal areas
su	unité sécrétoire / secretory unit
T	langue / tongue
TH	thalamus
TnG	ganglion du nerf terminal / terminal nerve ganglion
TT	taenia tecta
VMH	hypothalamus ventromédial / ventromedial hypothalamus
VNE	épithélium voméronasal / vomeronasal epithelium
VNO	organe voméronasal / vomeronasal organ
VNN	nerf voméronasal / vomeronasal nerve

Remerciements

Je tiens à remercier mon directeur de recherche Dr Jean-François Pflieger pour ses conseils, son soutien et ses encouragements tout au long de mes études. Je voudrais aussi remercier ma codirectrice Dre Thérèse Cabana pour ses encouragements et son optimisme.

Je remercie les laboratoires de Christopher Cameron et Réjean Dubuc pour m'avoir permise d'utiliser leur microscope à fluorescence.

J'aimerais également remercier mes collègues Frédéric et Marie-Josée pour leur soutien moral et tous les bons moments passés ensemble dans le laboratoire. En outre, je voudrais remercier Guillaume du laboratoire du Dr Annie Angers pour son aide et ses conseils. J'aimerais aussi mentionner tous les étudiants qui ont fait une initiation à la recherche au sein de notre laboratoire et les étudiants du laboratoire Angers dont j'ai eu le plaisir de connaître.

Finalement, j'aimerais remercier ma famille et mes amis pour leur soutien moral.

1. Introduction générale

Le clade des mammifères est divisé en trois sous-groupes: les monotrèmes, les eutheriens et les marsupiaux. Cette classification est basée sur des caractéristiques reproductives et développementales. Les monotrèmes sont des ovipares tandis que les eutheriens et les marsupiaux sont des vivipares. Les monotrèmes pondent des œufs à coquille molle qui, chez certaines espèces, éclosent au sein d'une poche abdominale temporaire. L'allaitement des petits s'effectue à travers de pores situés au niveau des glandes mammaires et non de mamelons entièrement développés (McAllan, 2010). Les eutheriens se caractérisent par un placenta bien développé et adapté à de longues périodes de gestation afin que les phases de croissance majeures de l'embryon puissent se dérouler *in utero* (Tynsdale-Biscoe & Janssens, 1988). Chez les marsupiaux, le temps de gestation est relativement court, mais leur développement postnatal est plus long. À la naissance, les nouveau-nés migrent du sinus urogénital vers une tétine maternelle pour s'y attacher. La plupart des espèces marsupiales possèdent un repli de peau appelé poche marsupiale ou marsupium qui recouvre les tétines et dans lequel les petits continueront leur maturation. Ce qui distingue avant tout les marsupiaux des mammifères eutheriens est donc l'état très immature des nouveau-nés (Tyndale-Biscoe, 2005). Certaines espèces de marsupiaux pouvant être élevées en captivité constituent de bonnes candidates pour étudier le développement des systèmes sensoriels et moteurs précoces chez les mammifères.

Notre laboratoire étudie la motricité et le développement postnatal des systèmes sensorimoteurs chez l'opossum *Monodelphis domestica*. Ce petit marsupial, facilement élevé en captivité, peut se reproduire à longueur d'année. C'est un mammifère généralisé (Cabana, 2000), c'est-à-dire qu'il ne possède aucune spécialisation motrice (contrairement au kangourou, par exemple, qui possède des membres postérieurs développés pour les sauts bipèdes) ou sensorielle particulière.

De plus, les femelles opossums ne possèdent pas de poche marsupiale, facilitant ainsi l'accessibilité aux animaux néonataux.

À la naissance, l'opossum possède des membres antérieurs assez développés pour lui permettre de ramper de l'orifice urogénital de la mère jusqu'à une tétine à laquelle il doit s'accrocher pour terminer sa maturation. Ce comportement moteur est autonome, car la femelle ne transporte pas le nouveau-né jusqu'à une tétine. Des informations sensorielles sont donc nécessaires afin que le nouveau-né trouve la tétine et s'y accroche.

Une étude récente au laboratoire (Adadja et al., 2013) a abordé la question des sens pouvant influencer la locomotion chez l'opossum nouveau-né en utilisant des techniques physiologiques et anatomiques. En effectuant des stimulations électriques de différentes régions de l'encéphale, les auteurs ont montré que le ganglion du nerf trijumeau et les régions vestibulaires étaient les plus à même de provoquer des extensions des membres. Par contraste, des stimulations des bulbes olfactifs demandaient des intensités trop élevées pour soutenir une influence de l'olfaction sur la motricité des membres, comme aussi pour des stimulations de centres auditifs ou visuels. Toutefois, en utilisant des techniques immunohistochimiques pour révéler le NF200, un neurofilament exprimé dans les fibres nerveuses ayant acquis une certaine maturité (Szaro & Strong, 2010), la même étude a révélé le marquage d'un faisceau de fibres nerveuses au niveau télencéphalique, le seul à être marqué, et qui relie la partie ventrocaudale des bulbes olfactifs à la lame terminale (*lamina terminalis*), en passant près de la zone germinale de l'hippocampe (Fig 1).

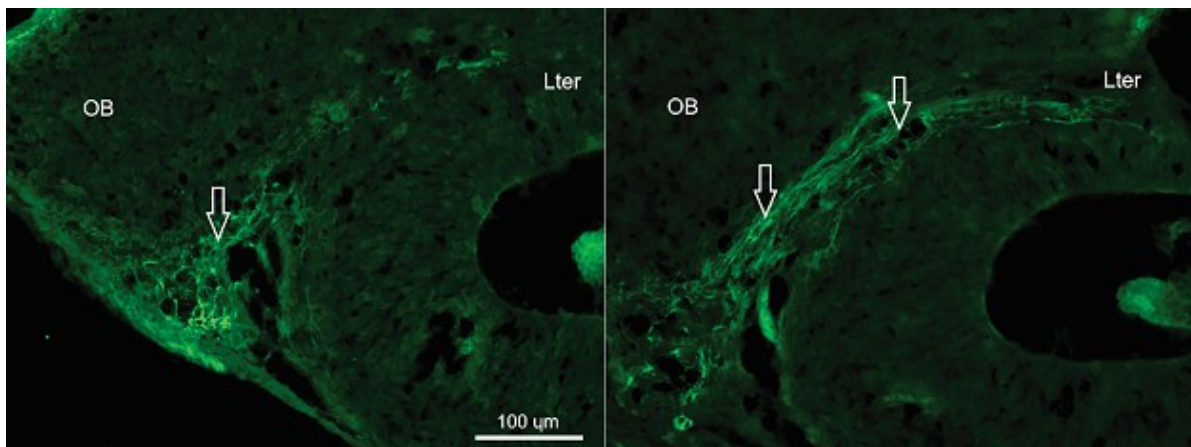


Fig 1. Coupes parasagittales d'un cerveau de nouveau-né d'opossum illustrant en vert le faisceau qui relie la partie ventrocaudale des bulbes olfactifs à la lame terminale. Ces axones sont les seuls au niveau du télencéphale à exprimer NF200, un marqueur de maturation, à cet âge. Rostral est vers la gauche et dorsal vers le haut. OB, bulbe olfactif; Lter, lame terminale.

L'existence de ce faisceau nerveux apparemment mature dans le télencéphale est intrigante et nous avons décidé d'étudier ce faisceau plus en profondeur afin d'en comprendre la fonction potentielle. Nous montrons qu'il s'agit très probablement du nerf terminal et qu'il joue un rôle dans le développement de l'innervation de l'hypothalamus par les fibres exprimant l'hormone de relâche des gonadotrophines (GnRH). Nos résultats confirment par ailleurs le peu de maturité des voies olfactives centrales, ce qui rend improbable l'implication de l'odorat dans les comportements moteurs de l'opossum nouveau-né.

Dans l'introduction qui suit, je présenterai le modèle de recherche et parlerai de l'organisation générale du système olfactif chez les mammifères ainsi que de son développement. J'aborderai aussi ce qui est connu sur le système des GnRH et sur le nerf terminal. J'énoncerai la problématique du projet avant de détailler la méthodologie suivie des résultats obtenus. Enfin, je discuterai des résultats en fonction de la littérature et offrirai une conclusion sur l'ensemble du projet.

1.1. Le modèle, l'opossum *Monodelphis domestica*

1.1.1. Morphologie à la naissance

L'opossum gris à queue courte (*M. domestica*) est un petit marsupial originaire d'Amérique du Sud. Puisque sa période de gestation dure seulement 14-15 jours, il naît dans un état très immature (Fig 1). L'état global du nouveau-né est grossièrement comparable aux stades embryonnaires 13-14 (E13-14) chez le rat et au jour embryonnaire 11,5 (E11,5) chez la souris avec, toutefois, des différences nécessaires pour permettre une activité *ex utero* précoce (Smith, 2001; Lavallée & Pflieger, 2009).



Fig 2. Opossum *Monodelphis domestica* au jour de la naissance.

Glabre à la naissance, le nouveau-né mesure environ 10 mm du museau à la croupe. Il possède une ceinture brachiale et des membres antérieurs plus développés que la ceinture pelvienne et les membres postérieurs. Au niveau des membres antérieurs, les articulations de l'épaule, du coude et du poignet sont discernables (Cassidy et al., 1994; Martin & Mackay, 2003; Barthelemy & Cabana, 2005). L'épaule et le coude ne permettent pas de mouvements du membre antérieur de grande amplitude, particulièrement du point de vue de la flexion. Les poignets sont plus souples et les mains possèdent des doigts quelque peu individualisés qui sont capables de mouvements d'extension et de flexion. Quant aux membres postérieurs, ils se résument à de courts bourgeons montrant une ébauche de doigts, émergeant du tronc et n'ayant pas d'articulations visibles. Au niveau de la tête, les yeux sont fermés et recouverts de peau et les oreilles externes ne sont pas démarquées (Cabana, 2000).

Le système nerveux central est moins développé que chez des rongeurs à des âges comparables (Brunjes et al., 1992; Cabana, 2000).

1.1.2. Comportements précoces du nouveau-né

Malgré son état très immature, une fois sorti du sinus urogénital, l'opossum nouveau-né est capable de grimper sur le ventre de la mère par ses propres moyens pour atteindre une tétine. La locomotion du nouveau-né consiste en des mouvements rythmiques et alternés de flexion et d'extension de faible amplitude des membres antérieurs pendant que le tronc se balance d'un côté à l'autre. Ces mouvements doivent être générés par des réseaux neuronaux localisés dans la moelle (Cabana, 2000). Les membres postérieurs, immobiles, suivent passivement le tronc. Les mains munies de fines griffes permettent au nouveau-né d'agripper les poils du ventre de la mère lors de son ascension. Aucune évidence n'indique la présence de comportements d'assistance de la part de la femelle marsupiale pour le passage des nouveau-nés de l'ouverture urogénitale à la tétine, sauf en ce qui concerne l'adoption d'une posture facilitant ou, au minimum, ne nuisant pas à la progression du nouveau-né, et le léchage des régions urogénitales (VandeBerg & Williams-Blangero, 2010).

Une fois que le nouveau-né a trouvé une tétine, il s'y accroche en avalant l'extrémité de celle-ci. L'extrémité va gonfler légèrement de manière à créer une dépression entre la langue et le palais. En parallèle, les tissus épithéliaux des lèvres du nouveau-né et ceux à la base de la tétine fusionnent. Le petit reste ainsi agrippé à la mère pendant environ trois semaines durant lesquelles il continue sa maturation. Étant donné l'état embryonnaire des membres postérieurs, ces derniers se développent avec quelques jours de délai par rapport aux membres antérieurs. Quant au développement des réflexes sensorimoteurs, les réflexes spinaux apparaissent avant les réflexes impliquant l'encéphale. Cassidy et al. (1994) ont observé au jour postnatal 14 (P14; P0 étant le jour de la naissance) que si les petits sont détachés de leur mère, ils peuvent commencer à pivoter; les membres antérieurs supportent leur poids tandis que l'arrière-train sert de pivot et que les membres postérieurs traînent passivement dans le mouvement de rotation. À la troisième semaine, l'opossum peut avancer en ligne

droite pour de petites distances, mais les membres postérieurs sont trop latéraux pour supporter leur poids. Ce n'est qu'à P24, à peu près quand ils commencent à se détacher naturellement de la mère, qu'une meilleure coordination entre les membres postérieurs et les membres antérieurs est observée. C'est autour de P30 que les réflexes nécessitant l'encéphale apparaissent, ceux passant par le tronc cérébral arrivent à maturité avant ceux impliquant le cervelet ou le cortex cérébral. Les petits retourneront à la tétine jusqu'à ce qu'ils soient sevrés vers 8 semaines.

1.1.3. Sens pouvant influencer les comportements précoces

La capacité du nouveau-né à se diriger de façon autonome, de trouver une tétine et de s'y accrocher ne pourrait pas être efficace sans l'implication d'un ou de plusieurs sens. Les systèmes sensoriels traditionnellement considérés comme pouvant le plus probablement guider le nouveau-né vers la tétine et provoquer l'attachement sont le système vestibulaire, le système du trijumeau et le système olfactif.

Le système visuel est un candidat peu probable, car chez les marsupiaux, les yeux sont recouverts de peau à la naissance. Chez l'opossum, ce n'est qu'à P3 que les premières fibres rétinofoves atteignent le chiasma optique et qu'à P5 que ces fibres atteignent le tractus optique (Taylor & Guillery, 1994). Aux alentours de P16, les axones tectaux commencent à rejoindre la moelle cervicale (Wang et al., 1992). Les réflexes visuels se mettent en place à P35, soit au moment où les paupières commencent à s'ouvrir (Cassidy et al., 1994).

Pareillement, le système auditif est à écarter étant donné que l'appareil auditif est très peu développé à la naissance. Chez l'opossum, les premiers potentiels auditifs évoqués apparaissent à P28 (Reimer, 1996). Les pavillons auriculaires se détachent seulement à P13-P14 et les canaux externes de l'oreille s'ouvrent à P30 (Cassidy et al., 1994). Il est donc difficile d'envisager la manière dont l'audition permettrait au nouveau-né de trouver des informations sur sa destination.

Le système vestibulaire, responsable principalement du sens de l'équilibre, perçoit l'orientation de la tête par rapport à la gravité ainsi que les accélérations linéaires et

angulaires lors des mouvements. L'information sensorielle est encodée par les organes sensoriels du saccule, de l'utricule et des canaux semi-circulaires situés dans l'oreille interne (Cullen, 2012; Golberg et al., 2013; Uchino & Kushiro, 2011). Chez l'opossum nouveau-né, la macule utriculaire est innervée par les cellules ganglionnaires vestibulaires et quelques-unes de ces dernières possèdent déjà des projections centrales vers le complexe vestibulaire dont les principaux noyaux sont le noyau vestibulaire supérieur, le noyau vestibulaire latéral, le noyau vestibulaire médial et le noyau vestibulaire inférieur. Ces trois derniers contiennent des cellules qui projettent vers la moelle épinière (Pflieger & Cabana, 1994). L'étude de Adadja et al. (2013) suggère que les voies centrales sont fonctionnelles chez l'opossum nouveau-né, mais sont moins efficaces à évoquer l'extension des membres antérieurs que le système du trijumeau.

Le système du trijumeau encode différentes informations sensorielles tactiles, thermiques, chimiques et nociceptives provenant du visage, de la cavité orale et de la cavité nasale. Ces informations sont relayées par le nerf trijumeau au tronc cérébral (Desmarais, 2015; Go et al., 2001; Saper et al., 2013). Chez le rat nouveau-né placé *in vitro*, des stimulations électriques appliquées sur le nerf trijumeau provoquent des potentiels post-synaptiques dans les motoneurones et des bouffées de potentiel d'action dans les racines ventrales lombaires de la moelle épinière (Vinay et al., 1995). Chez l'opossum nouveau-né, les cellules des noyaux spinaux du trijumeau envoient déjà des projections à la moelle cervicale, ce qui laisse entrevoir un rôle possible du toucher et de certaines autres modalités sensorielles transmises par le système du trijumeau sur le contrôle moteur spinal (Wang et al., 1992). Une étude récente (Desmarais et al., 2016) a démontré que des pressions exercées sur le visage entraînent des réponses motrices sur des préparations *in vitro* d'opossum nouveau-né et ces réponses disparaissent lorsque la peau du visage est retirée.

Le système olfactif est responsable de la perception générale des composés olfactifs volatils et de la perception des phéromones (Ubeda-Bañon et al., 2011). Des études chez plusieurs marsupiaux nouveau-nés semblent indiquer que l'olfaction aurait un

rôle de guidage (Schneider et al., 2009). Comme nous l'avons vu, l'étude de Adadja et al. (2013) suggère que ce n'est pas le cas chez l'opossum nouveau-né. Néanmoins, ce faisceau relativement mature reliant les OB au cerveau antérieur jette un doute sur le stade de développement du système olfactif.

1.2. Système olfactif

Le système olfactif est divisé en deux grandes composantes : le système olfactif principal et le système olfactif accessoire. Le système olfactif principal est associé à la perception générale des composés volatils alors que le système olfactif accessoire est plutôt associé à la perception des phéromones (Ubeda-Bañon et al., 2011). Il existe aussi des sous-systèmes olfactifs, tels que l'organe septal et le ganglion de Grüneberg, qui ne seront pas vus en détail dans le présent mémoire. Les principales composantes périphériques (Fig.3) et centrales (Fig.4) des systèmes olfactifs principal et accessoire chez les mammifères sont schématisées sur les figures 3 (tirée de Canavan et al., 2011) et 4 (tirée de Halpern et al., 2005).

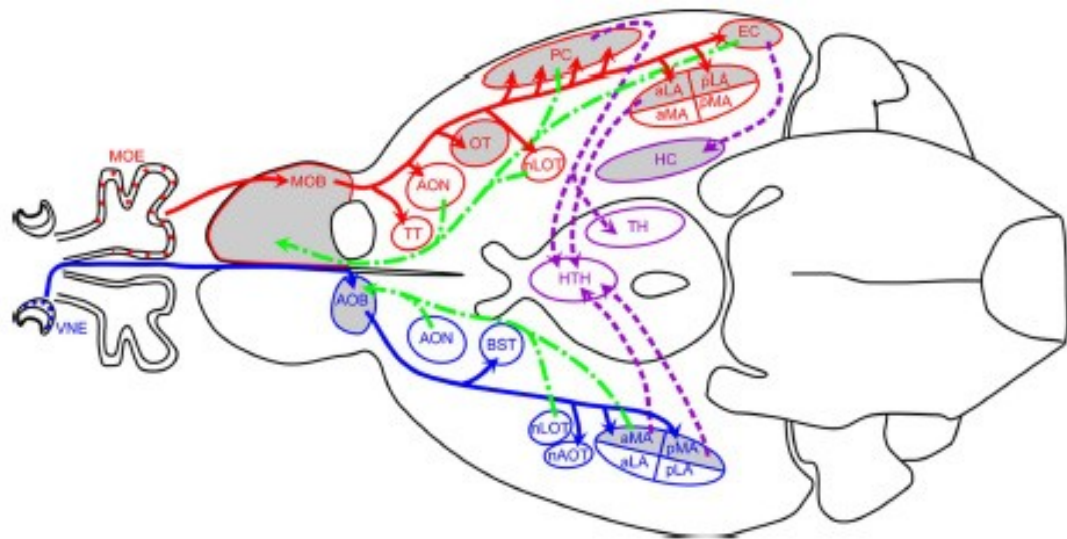


Fig 3. Schéma des voies centrales majeures du système olfactif principal (en rouge) et du système olfactif accessoire (en bleu) sur une vue ventrale du cerveau de souris adulte. L'épithélium olfactif principal (MOE) et l'épithélium voméronasal (VNE) sont aussi illustrés. aLA, amygdale antérieure latérale; aMA, amygdale antérieure médiale; AOB, bulbe olfactif accessoire; AON, noyau olfactif antérieur; AOT, tractus olfactif accessoire; BST, le noyau du lit de la strie terminale; EC, cortex entorhinal; HC, hippocampe; HT, hypothalamus; LOT, tractus olfactif latéral; MOB, bulbe olfactif principal; nAOT, noyau du tractus olfactif; nLOT, noyau du tractus olfactif latéral; OT, tubercule olfactif; PC, cortex piriforme; pLA, amygdale postérieur latéral; pMA, amygdale postérieur médial; TH, thalamus; TT, tectum; VMH, hypothalamus ventromédial. Rostral est vers la gauche. (Tiré de Canavan et al., 2011)

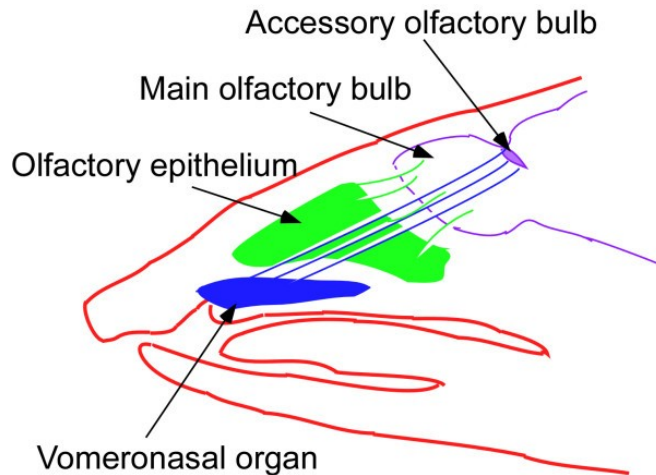


Fig 4. Schéma d'une coupe parasagittale d'une tête d'opossum illustrant la position de l'organe voméronasal, de l'épithélium olfactif et de leurs connexions au bulbe olfactif principal et au bulbe olfactif accessoire. Rostral est vers la gauche. (Tiré de Halpern et al., 2005)

Le système olfactif principal est composé de l'épithélium olfactif principal (MOE), du bulbe olfactif (OB), de structures sous-corticales comme le tubercule olfactif et l'amygdale, et de différentes régions corticales (Ma, 2010; Canavan et al., 2011). Chez les mammifères, l'épithélium pseudostratifié du système olfactif principal est localisé dans la voûte de la cavité nasale. On y retrouve une population hétérogène de cellules, incluant des cellules sensorielles dont les prolongements s'étalent à la surface de l'épithélium. Ces prolongements sont recouverts de récepteurs moléculaires capables de détecter différents signaux volatils. Chaque neurone olfactif envoie un axone vers l'OB. Ces axones se réunissent en de petits faisceaux longeant la muqueuse nasale pour constituer le nerf olfactif, nerf I. Le nerf olfactif franchit le crâne au niveau de la lame criblée de l'os ethmoïde pour atteindre le premier centre olfactif, le neuropile glomérulaire des bulbes olfactifs principaux. La paire d'OB est disposée au-dessus des cavités nasales. Chaque OB est divisé en plusieurs couches : de la plus superficielle à la plus profonde, il y a la couche du nerf olfactif, la couche glomérulaire, la large couche plexiforme externe, la mince couche de cellules mitrales, la couche plexiforme interne réduite et la couche de cellules granulaires. La couche glomérulaire doit son nom aux glomérules, des structures caractéristiques à forme sphérique constituant les sites de synapses entre les collatéraux des axones des nerfs

olfactifs et les dendrites des cellules mitrales (Ma, 2010) ainsi que des synapses impliquant les neurones périglomérulaires (Kosaka & Kosaka, 2005). Les cellules mitrales sont les principaux neurones efférents de l'OB, leurs axones sont dirigés vers les structures corticales et sous-corticales. Les axones des cellules mitrales forment le tractus olfactif latéral, la principale voie olfactive centrale. Les fibres quittent peu à peu le tractus olfactif latéral pour rejoindre différentes régions centrales sans passer par des connexions thalamiques. Même si toutes ces régions ne sont pas corticales à proprement parler, elles sont parfois réunies sous le vocable « cortex olfactif ». Il est généralement accepté que les principales cibles des fibres issues du OB de *Monodelphis domestica* incluent le noyau olfactif antérieur, le taenia tecta (une portion antérieure du cortex cingulaire ou paraterminal), le tubercule olfactif, le cortex piriforme, les noyaux amygdaliens antérieur et postérolatéral, la région latérale du cortex entorhinal et le noyau du tractus olfactif latéral (Martinez-Marcos & Halpern, 2006). Le trajet des efférences bulbaires est plutôt latéral et ventral le long de la portion caudale des bulbes olfactifs et se dispose ventralement sous le cerveau. Les cibles centrales de ces voies sont majoritairement ventrales et latérales.

Le système olfactif accessoire, nommé également système voméronasal, est mieux étudié chez les tétrapodes terrestres (Meisami & Bhatnagar, 1998). Il comporte trois principales structures: l'organe olfactif accessoire ou organe voméronasal (VNO), le bulbe olfactif accessoire (AOB) et l'amygdale voméronasale (Salazar & Quinteiro, 2009). Le VNO est une structure paire située juste au-dessus de l'os vomer, de part et d'autre de la base ventrale du septum nasal. Logé dans une capsule cartilagineuse, le VNO est composé d'un canal tapissé d'un épithélium sensoriel dont la partie antérieure s'ouvre dans la cavité nasale. L'épithélium voméronasal comprend les cellules basales, sensorielles et de support. Les axones des neurones sensoriels vont former les nerfs voméronasaux. Tout comme pour les nerfs olfactifs, les nerfs voméronasaux sont formés d'axones issus de cellules sensorielles et cheminent le long du septum nasal, traversent la lame criblée de l'os ethmoïde pour entrer dans l'OB. Ils continuent à monter le long de la surface médiale des OB jusqu'à atteindre les régions dorsales, où ils poursuivent leur chemin caudalement jusqu'au bulbe olfactif

accessoire (AOB) pour faire synapse sur les dendrites des cellules mitrales et des cellules à panaches dans des glomérules accessoires (Meisami & Bhatnagar, 1998; Martinez-Marcos & Halpern, 1999). L'AOB est une structure paire laminée et semblable à l'OB. De plus petite taille, il est accolé dorsalement et médialement à la portion caudale de l'OB. Globalement, il possède une organisation cytoarchitectonique similaire à l'OB avec une couche nerveuse, une couche glomérulaire et une couche granulaire bien démarquées. Cependant, les deux couches plexiformes sont moins distinguables. Les projections axoniques des neurones localisés dans l'AOB vont principalement à l'amygdale voméronasale. Cette dernière englobe le noyau de la strie terminale, le noyau du lit du tractus olfactif accessoire, le noyau cortical amygdalien postéromédial et le noyau amygdalien médial (Salazar & Quinteiro, 2009) (Figure 4).

1.2.1 Développement du système olfactif chez les mammifères

1.2.1.1. Développement du système olfactif chez les euthériens

Chez les euthériens, les phases principales de développement se déroulent *in utero*. Pour la plupart, le système olfactif périphérique est assez développé à la naissance pour transmettre des informations chimiosensorielles au système nerveux central (Pedersen et al., 1983; Schaal, 2010; Schaal & Orgeur, 1992).

Pour prendre un exemple de mammifères euthériens de taille comparable à l'opossum : chez le rat, la différenciation de l'épithélium olfactif se fait entre E12 et E19 et celle du VNO entre E14 à E16 (Paxinos et al., 1994). La croissance du nerf olfactif a lieu entre E13 à E16 alors que celle du nerf voméronasal vers l'AOB s'effectue entre E14 et E16 (Valverde et al., 1992). La croissance des axones des cellules mitrales pour former le tractus olfactif latéral débute vers E15 à E16, une tranche d'âge qui voit aussi le début de la corticalisation du tubercule olfactif (Atman & Bayer, 1995; Bayer & Altman, 2004; Malun & Brunjes, 1996). La maturation structurale des cellules mitrales commence à E16 (Santacana et al., 1992) alors que l'émergence de glomérules s'effectue entre E19 et la naissance (E21,5) (Tenne-Brown & Key, 1999; Treloar et al., 1999). À la naissance, la plupart des cellules mitrales possèdent de nombreux

prolongements dendritiques étendus, dont certains sont ramifiés. De petits prolongements peuvent aussi être observés aux régions axoniques. À P4, certaines cellules mitrales commencent à montrer une morphologie mature : une dendrite principale avec des terminaisons ramifiées dans les couches externes du bulbe olfactif et des dendrites accessoires émergeant du corps cellulaire. La majorité des cellules mitrales possèdent une morphologie typiquement mature à P10 (Malun & Brunjes, 1996). L'activité neuronale débute avant la naissance dans les OB. En effet, quelques heures après la naissance, l'activité spontanée attribuable aux cellules mitrales peut déjà être enregistrée dans les bulbes olfactifs (Math & Davrainville, 1980).

Au niveau du cortex piriforme, la neurogénèse débute vers E14, sa corticalisation vers E16, et les deux processus se poursuivent jusqu'à environ E19 (Bayer & Atman, 2004; Malun & Brunjes, 1996). Entre E15 à E19, la couche pyramidale se différencie dans ce cortex (Atman & Bayer, 1995).

1.2.1.2. Développement du système olfactif chez les marsupiaux

La plupart des marsupiaux naissants présentent de larges narines ouvertes (Fig 5), ce qui a amené plusieurs chercheurs à voir l'olfaction comme un des sens permettant de guider le nouveau-né vers les tétines (voir Sharman, 1973; Schneider, 2011). Si leur cerveau antérieur est peu développé dans l'ensemble, les bulbes olfactifs sont davantage développés que le diencephale et le mésencéphale (Gemmell & Nelson, 1988).

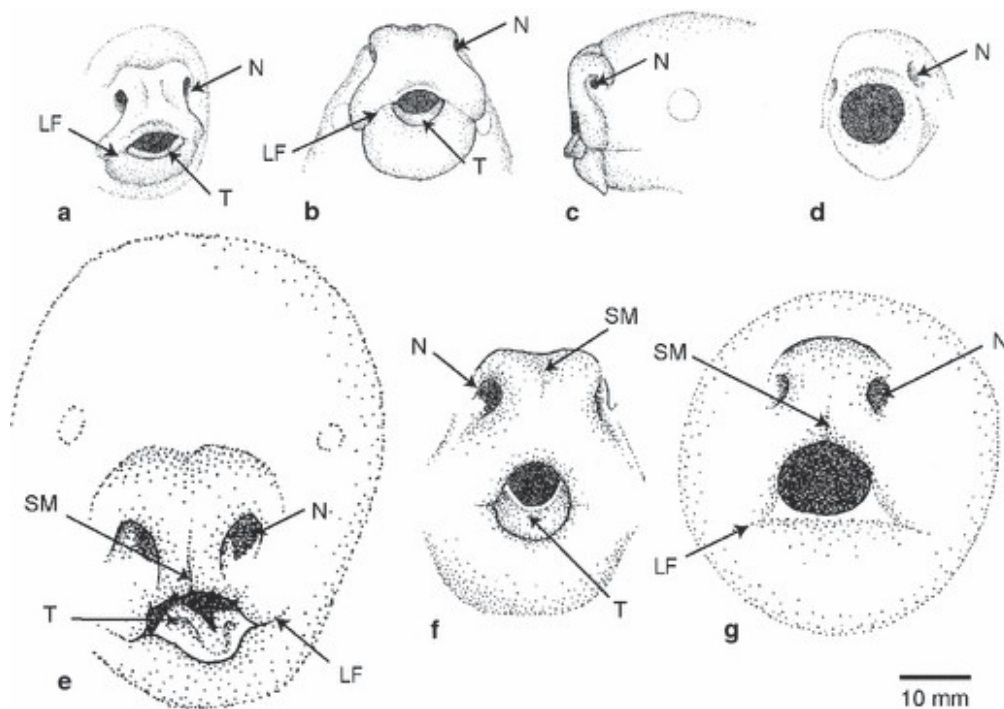


Fig 5. Stade du développement du rhinarium (ou truffe) chez les marsupiaux néonataux. L'opossum de Virginie (a) et l'opossum gris à queue courte (b,c) possèdent une structure s'apparentant à un bouclier oral avec le repli des lèvres légèrement visible. Par contre, le chat marsupial du nord (d) a un bouclier oral très bien développé. Le bouclier oral est vestigial chez le koala (e) et il est simple chez le possum australien (f) et le bandicoot brun du sud (g). LF, repli des lèvres; N, narine; SM, sulcus medianus; T, langue. (Tiré de Schneider, 2011)

L'état de développement de l'épithélium olfactif à la naissance varie chez les marsupiaux même si, dans l'ensemble, il est relativement développé avec des cellules sensorielles et de soutien visibles (Gemmell & Nelson, 1988). Chez le chat marsupial du nord (*Dasyurus hallucatus*), le possum australien (*Trichosurus vulpecula*) et le bandicoot brun du nord (*Isodon macrourus*), des fibres du nerf olfactif peuvent être observées entre l'épithélium olfactif et les OB dès la naissance (Gemmell & Nelson, 1988). Par contre, le VNO n'est pas encore bien développé (Gemmell & Rose, 1989). L'OB est toujours immature à la naissance, car les cellules mitrales ne sont pas morphologiquement différenciées. Kratzing (1986) a observé que le système olfactif principal et le VNO du bandicoot deviennent matures vers P35 et a conclu qu'ils sont trop immatures à la naissance pour que l'olfaction soit un sens qui guide le nouveau-

né à la poche ou à la tétine. Cependant, selon Gemmell et Nelson (1988), le fait que le système olfactif est en développement n'exclut pas la possibilité que le nouveau-né soit capable de détecter les odeurs.

Ashwell et al. (2008) ont étudié en détail le développement morphologique du système olfactif chez un wallaby (*Macropus eugenii*), dont la période de gestation, à 27 jours, est plus longue que celle de notre opossum. Ceci leur a permis d'établir une comparaison avec d'autres mammifères (tableau I). À la naissance, le système olfactif de ce marsupial est comparable à celui du rat à E14 : l'épithélium olfactif principal possède des neurones sensoriels ayant un renflement apical dans leur prolongement dendritique nommé bouton olfactif, lequel possède déjà des cils. Ces neurones expriment la protéine G_{α} , qui permet la transduction des signaux moléculaires odorants (Schneider et al., 2009). De plus, ces neurones envoient déjà leurs axones au bulbe olfactif, axones suffisamment matures pour exprimer la protéine GAP-43 (marqueur de croissance neuronale pour l'élongation de neurites et la formation de synapses). Les neurones sensoriels sont donc reliés au cerveau, ce qui pourrait permettre la perception et la transmission du signal. Le VNO est présent à la naissance, bien qu'immature morphologiquement, et fait déjà contact avec la cavité nasale; son épithélium sensoriel est innervé par une branche du *nervus terminalis* (Schneider et al., 2009).

Il y a cependant plusieurs aspects fonctionnels importants dans la maturation de l'épithélium olfactif et de la voie olfactive centrale qui ne se développent qu'après la première semaine postnatale (Ashwell et al., 2008). Par exemple, la morphologie mature des neurones sensoriels n'est acquise qu'entre P5 à P12. Ce n'est qu'à partir de P5 que l'expression de GAP-43 est visible dans les prolongements apicaux des neurones sensoriels. La corticalisation de l'OB apparaît à la fin de la deuxième semaine postnatale et les glomérules se forment vers P25. Ce n'est qu'à partir de la deuxième semaine postnatale que les cellules mitrales envoient des projections centrales vers le télencéphale. Le cortex olfactif ne commence sa différenciation que vers la fin de la troisième semaine postnatale. De plus, c'est vers la fin de la première

semaine postnatale que le VNO et les fibres efférentes de l'AOB se développent. Ashwell et al. (2008) ont donc conclu qu'il était peu probable que l'olfaction joue un rôle significatif dans le guidage du nouveau-né wallaby vers le marsupium.

D'ailleurs, une étude de l'ontogénie de l'activité neuronale des neurones de l'OB employant des enregistrements électrophysiologiques chez le wallaby a mis en évidence que le début des réponses neuronales suite à des stimulations chimiques périphériques se situerait aux environs de P38 (Ellendorff et al., 1988). Les signaux des neurones enregistrés sont de faible amplitude jusqu'à P80. Il est donc peu probable qu'il y ait des connexions fonctionnelles à la naissance pour cette espèce.

Tableau I. Comparaison du dérours temporel de développement des voies centrales olfactives chez le Wallaby *Macropus eugenii*, l'opossum gris à queue courte *Monodelphis domestica* et le rat *Rattus norvegicus* (D'après Ashwell et al., 2008)

Évènements	<i>Macropus eugenii</i>	<i>Monodelphis domestica</i>	<i>Rattus norvegicus</i>
Différenciation de l'épithélium olfactif	Prénatal à P5	P0 à après P10 ⁴	E12 à E19 ¹⁰
Différenciation du VNO	P0 à P12	E13 à P21 ⁶	E14 à E16 ¹⁰
Croissance du nerf voméronasal vers l'AOB	P5 à P12	P3 à P21 ⁶	E14 à E16 ^{8,10}
Corticalisation de l'OB	P12 à P19	P0 à P16 ³	E16 à E19 ²
Émergence des glomérules	P25 à P54	P10 à P15 ⁷	E19 à P0 ^{12,13}
Maturation structurale des cellules mitrales	P5 à après P34	P3 à P25 ¹¹	E16 à P4 ¹¹
Activité neuronale dans l'OB	À partir de P38 ⁵	-	Avant P0 ⁹
Excroissance du tractus olfactif latérale	P5 à P12	P3 ⁶	E15 à E16 ¹
Neurogenèse du cortex piriforme	P0, P5	-	E13 à E19 ²
Émergence de la couche pyramidale dans le cortex piriforme	P12 à P21	-	E15 à E19 ¹
Corticalisation dans le tubercule olfactif et apparition des cellules granulaires	P12 à P21	-	E16 à E19 ³

¹ Altman and Bayer [1995]; ² Bayer and Altman [2004]; ³ Brunjes et al. [1992]; ⁴ Couper et al. [1999]; ⁵ Ellendorff et al. [1988]; ⁶ Jia et al. [1997]; ⁷ Malun and Brunjes [1996]; ⁸ Marchand and Bélanger [1991]; and Davrainville [1980]; ¹⁰ Paxinos et al. [1994]; ¹¹ Santacana et al. [1992a, b]; ¹² Tenne-Brown and Key [1999]; ¹³ Treloar et al. [1999].

Si les résultats anatomiques (Ashwell et al., 2008) et physiologiques (Ellendorf et al., 1988) plaident en faveur d'une maturation tardive de l'odorat chez le wallaby, ils sont potentiellement contredits par l'étude comportementale de Schneider et al. (2009). En

effet, ces auteurs ont placé des nouveau-nés sur une fourrure où sont disposés, au-dessus et de part et d'autre du wallaby, un coton imbibé de saline ayant servi à rincer le marsupium maternel et un autre imprégné de saline. Quinze animaux testés sur vingt ont grimpé initialement en ligne droite avant de s'orienter vers le coton imbibé d'odeur de la poche maternelle. À proximité du coton, le nouveau-né se retourne et grimpe contre l'inclinaison, ce qui pourrait aider le petit à rentrer dans le marsupium. Schneider et al. (2009) considèrent ces résultats et certains résultats anatomiques suggérant une certaine maturité relative de l'épithélium olfactif et des bulbes, en faveur de l'usage de l'odorat dès la naissance pour trouver le marsupium.

Des résultats semblables avaient été observés auparavant chez l'opossum à queue en brosse (*Trichosurus vulpecula*), suggérant ainsi que le guidage de la locomotion se ferait par l'olfaction et le géotropisme négatif (système vestibulaire). En effet, le nouveau-né a tendance à grimper contre la gravité et lorsqu'il se trouve aux alentours de la poche marsupiale, il bifurque pour y rentrer et s'accrocher à une tétine. Veitch et al. (2000) ont retiré un nouveau-né *Trichosurus vulpecula* de la poche marsupiale et l'ont placé à différents endroits sur le ventre de la mère anesthésiée pour observer sa progression vers la poche. S'il est placé à un rayon de 3 cm autour de la poche, le nouveau-né réussit toujours à rentrer dans la poche marsupiale, indépendamment de la position de la mère. Si la poche est maintenue fermée, même si le nouveau-né est placé juste en dessous de la poche, il continue à grimper vers le haut et dépasse la poche. Cependant, une fois qu'il a dépassé la poche fermée et que l'on ouvre la poche, le nouveau-né tourne à 180° et réussit à rentrer dans la poche ouverte. Cela suggère que des composés volatils émanant de la poche marsupiale attireraient le nouveau-né. Toutefois, les résultats comportementaux pourraient être expliqués par d'autres systèmes chimiosensoriels, dont le goût, véhiculé par le nerf trijumeau.

1.2.1.3. Développement du système olfactif chez l'opossum

Chez l'opossum néonatal, certains neurones olfactifs situés dans l'épithélium olfactif principal et certaines cellules des régions ventrales des OB sont immunoréactifs à des

anticorps dirigés contre la protéine marqueur de l'olfaction (*Olfactory Marker Protein*, OMP) et à la carnosine (Tarozzo et al., 1995). L'OMP, dont la fonction exacte n'est pas encore connue, est généralement considérée comme un marqueur associé à un stade mature des neurones olfactifs. La carnosine est un autre marqueur de neurone olfactif mature. Chuah et al. (1997), ont toutefois remarqué que la distribution de l'OMP est irrégulière et reflète l'expression initiale de la protéine telle qu'observée chez le rat à E14. Cette disparité est observable jusqu'à la fin de la première semaine postnatale de l'opossum, ce qui suggère que le taux de différenciation des neurones est assez lent.

Chez le nouveau-né d'opossum, les neurones sensoriels apparaissent morphologiquement immatures, car il y a peu de boutons olfactifs présents sur la surface épithéliale et la plupart d'entre eux sont dénués de cils (Chuah et al., 1997). De plus, l'absence des glandes de Bowman dans la propria lamina jusqu'à P9 laisse des doutes quant à la fonctionnalité de l'épithélium olfactif à la naissance. En effet, la majorité du mucus couvrant la surface olfactive épithéliale provient de sécrétions des glandes de Bowman et ce mucus contient des protéines qui se lient aux odorants solubles et les modifient pour qu'ils deviennent accessibles aux récepteurs situés sur les cils des neurones olfactifs (Chuah et al., 1997). Il a toutefois été proposé qu'un faible nombre de neurones olfactifs matures serait suffisant pour que l'olfaction soit minimalement fonctionnelle à la naissance. Harding et al. (1978) ont montré que des souris adultes dont l'épithélium olfactif avait été détruit par application intranasale de $ZnSO_4$ pouvaient encore réussir à localiser la nourriture avec moins de 10% de cellules olfactives fonctionnelles. Il est à noter, toutefois, que ces observations ont été faites sur des souris adultes, donc possédant un système olfactif déjà développé et fonctionnel. De plus, on ne sait pas ce qui en serait sur des souris n'ayant jamais eu d'expériences olfactives antérieures.

Comme chez les autres marsupiaux, les fibres olfactives du nouveau-né d'opossum ont déjà établi contact avec les OB, et le marqueur de cellules gliales S-100b est présent dans les fascicules du nerf olfactif à la naissance. La protéine acide fibrillaire

gliale (GFAP), un marqueur astrocytaire, apparaît seulement à P5 (Cummings & Brunjes, 1995). La présence de ces antigènes indique que les cellules engainantes sont assez différenciées durant la période néonatale et qu'elles pourraient être aptes à guider les nerfs vers leur cible appropriée. Par contre, les OB sont encore morphologiquement immatures et non corticalisés et aucune synapse n'est observée en microscopie électronique dans les bulbes olfactifs avant P3 (Chuah et al., 1997). Les cellules mitrales ne commencent à se différencier que durant la 2^e semaine postnatale et les glomérules n'apparaissent qu'à partir de la 3^e (Chuah et al., 1997). Les synapses entre les axones olfactifs afférents et les cellules mitrales se forment en même temps que la maturation morphologique des cellules mitrales. À P17, le nombre de dendrites formées par les cellules mitrales décroît jusqu'à ce qu'il ne reste qu'une dendrite primaire (Malun & Brunjes, 1996). Les cellules à panache ne sont pas reconnaissables avant P11-P16. À partir de P15, ces cellules apparaissent dans la région superficielle de la couche des cellules mitrales, suggérant ainsi que les cellules à panache ont projeté leurs axones dans le tractus olfactif latéral (Malun & Brunjes, 1996).

La comparaison entre les décours temporels du développement du système olfactif de l'opossum, du rat et du wallaby qui se trouve dans le tableau I (d'après Ashwell et al., 2008) montre que le système olfactif de l'opossum à la naissance correspond à E13-15 chez le rat. Au niveau du système nerveux central, les différences majeures observées chez l'opossum sont un retard dans le début des processus développementaux et une durée plus longue de ces processus. Par exemple, de nombreuses connexions synaptiques se retrouvent dans les régions centrales du bulbe olfactif au jour de la naissance chez le rat alors que, même au terme de la deuxième semaine postnatale, il n'y en a peu à ce niveau chez l'opossum (Malun & Brunjes, 1996). Le système olfactif du wallaby à la naissance est semblable à celui de l'opossum en termes de composantes et d'état de développement, mais la maturation chez le wallaby est encore plus lente que chez l'opossum, et cela en tenant compte de la plus longue gestation déjà mentionnée. Par exemple, chez l'opossum, la corticalisation de l'OB a lieu entre P0 à P16, l'émergence des glomérules a lieu entre

P10 à P15 et la maturation des cellules mitrales a lieu entre P3 à P25, alors que chez le wallaby, ces trois étapes ont lieu respectivement entre P12 à P19, entre P25 à P54 et à partir de P5 jusqu'après P34 (Ashwell et al., 2008). Par contre, il semblerait que le système voméronasal se développe plus lentement chez l'opossum que chez le wallaby. Ces observations morphologiques laissent planer des doutes quant à la fonctionnalité du système olfactif chez les marsupiaux nouveau-nés, y compris l'opossum.

Lors de leur étude sur le système olfactif de l'opossum, Chuah et al. (1997) ont aussi noté une population de cellules exprimant l'OMP. Ces cellules se retrouvaient principalement entre l'épithélium olfactif et l'OB à P0 et le long du septum nasal à P11, ce qui suggère qu'elles sont en migration chez l'opossum immature.

Ce marquage à l'OMP disparaîtrait chez l'adulte, car les seules cellules immunoréactives à l'OMP retrouvées dans le cerveau antérieur à cet âge possèdent une morphologie ressemblant davantage aux cellules gliales qu'aux cellules sensorielles olfactives. Cela laisse suggérer que cette population de cellules exprimant l'OMP chez l'adulte est différente de la population de cellules exprimant l'OMP chez l'immature. De manière similaire, chez le rat à E16 et la souris à E14, des cellules immunomarquées à l'OMP semblent aussi migrer de l'épithélium olfactif jusqu'au-dessus de la lame criblée, et le marquage OMP associé à cette population disparaît à la naissance (Valverde et al., 1993; Tarozzo et al., 1995).

1.3. Le nerf terminal

Le nerf terminal (ou *nervus terminalis*) est un petit groupe de fibres nerveuses s'étendant du septum nasal à la région de la strie olfactive médiale en passant par la lame criblée (Vilensky, 2012). Ce nerf est lié aux dérivés de la placode olfactive (nerf olfactif et nerf voméronasal) et, durant le développement embryonnaire, les neurones qui le composent migrent de la région de la placode olfactive jusqu'aux régions nasales et de leurs cibles dans le cerveau (Whitlock, 2004). Il existe une incertitude

quant au lieu de naissance de ces neurones. Ils proviennent peut-être de la crête neurale, mais pourrait provenir de la placode (Whitlock, 2005).

Le rôle du nerf terminal demeure encore incertain, même si des études fonctionnelles suggèrent qu'il agit comme un système neuromodulateur impliqué dans la reproduction. Les stimuli spécifiques contrôlant le niveau d'activité de ce nerf sont encore grandement inconnus (Wirsig-Wiechmann & Wiechmann, 2002).

De par la nature diffuse du nerf terminal, Wirsig-Wiechmann & Wiechmann (2002) ont proposé de le définir comme ayant les caractéristiques suivantes :

- A) les corps cellulaires se trouvent soit dans les cavités nasales soit dans la périphérie du bulbe olfactif;
- B) les fibres nerveuses relient les muqueuses chimiosensorielles nasales et les régions du cerveau antérieur ventral, spécifiquement dans les régions limbiques, olfactives et hypothalamiques;
- C) les corps cellulaires reçoivent des afférences des régions centrales du cerveau.

Chez les mammifères adultes, le nerf terminal forme un plexus ganglionnaire dans les régions médiales du tractus olfactif et des bulbes olfactifs (Vilensky, 2012). Ce plexus est composé de plusieurs types de neurones: les neurones exprimant l'hormone de relâche des gonadotrophines (GnRH), d'autres expriment l'acétylcholine ou d'autres encore le neuropeptide Y avec le peptide apparenté au térapeptide cardioaccélérateur des mollusques (FMRFamides/NPY). Ces neurotransmetteurs seraient contenus par des neurones ou fibres différentes, sans co-localisation notable. Les corps cellulaires du nerf terminal sont localisés soit dans la cavité nasale en petits groupes et étroitement associés aux nerfs chimiosensoriels, soit dans des ganglions nommés ganglions terminaux, situés dans le fluide externe cérébrospinal ventrocaudal à l'OB. Le ganglion terminal est de taille et de forme variables selon les espèces. Il peut se retrouver sous forme d'un groupe arrondi de cellules ou d'une bande de neurones alignés, mais cela varie (Jennes, 1987). À titre d'exemple, chez les rongeurs, la distribution du ganglion terminal est différente selon les espèces : le rat

possède un large ganglion terminal dans la région ventropostérieure du OB caudal, tandis que le hamster possède un ganglion terminal dans le rudiment hippocampal antérieur (indusium griseum et taenia tecta rostral et ventral) ainsi qu'un ganglion terminal secondaire adjacent à l'artère cérébrale antérieure. Chez l'opossum, le ganglion terminal est en forme de bandes et il est orienté parallèlement à l'axe rostrocaudal des bulbes olfactifs (Zheng et al., 1990). Tel que mentionné plus haut, ce ganglion est composé de neurones exprimant différents neurotransmetteurs et de cellules satellites. Les neurones exprimant la GnRH sont souvent utilisés pour caractériser ce nerf (Wirsig-Wiechmann et Wiechmann, 2002). La localisation et la distribution de ces neurones exprimant la GnRH seront abordées plus en profondeur dans la section suivante (1.4).

Chez les mammifères, l'innervation périphérique du nerf terminal se distribue principalement dans la lamina propria des muqueuses des régions olfactives, de l'organe voméronasal et de la région antérieure de l'organe voméronasal. Des terminaisons du nerf terminal sont aussi retrouvées à proximité de petits capillaires fenestrés de la sous-muqueuse respiratoire (Jennes, 1987). Les fibres du nerf terminal longent le septum nasal rostral vers le ganglion terminal, traversent la lame criblée de façon médiale par comparaison aux fibres olfactives, puis sont étroitement apposées sur la surface ventromédial des OB (Vilensky, 2012).

Chez la plupart des rongeurs, les projections du nerf terminal dans les régions nasales du nerf terminal sont si étroitement apposées sur les fibres voméronasales et olfactives qu'il est presque impossible de les distinguer anatomiquement. De fait, chez ces espèces, le nerf terminal est tellement assimilé au nerf voméronasal qu'il est parfois nommé branche caudale du nerf voméronasal (Wray, 2010). Par contre, chez l'opossum, le nerf terminal est clairement distinct du nerf olfactif et voméronasal (Schwanzel-Fukuda et al., 1988).

L'innervation centrale du nerf terminal chez les mammifères comprend principalement les régions rostrales du cerveau. Les fibres nerveuses quittant le ganglion terminal

s'étendent le long des régions ventrales des OB jusqu'aux régions caudales, où elles pénètrent dans le télencéphale ventral (Bojsen-Møller, 1975). Selon la position des ganglions terminaux, le trajet emprunté par les prolongements centraux du nerf terminal peut différer selon les espèces, mais ultimement, leurs destinations sont les régions du cerveau antérieur ventral, spécifiquement les régions limbiques, olfactives et hypothalamiques. Le nerf terminal est aussi associé étroitement avec le noyau médial de l'amygdale (Jennes, 1987), où se terminent de nombreuses projections relayant les inputs voméronasaux.

1.4. GnRH

1.4.1. Caractérisation du GnRH

L'hormone de relâche des gonadotrophines (GnRH) est une neurohormone impliquée dans l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique. Elle joue un rôle essentiel dans la régulation des fonctions reproductives. Comme son nom l'indique, la GnRH est un facteur de relâche des hormones produites par l'hypophyse, et plus précisément celles qui agissent sur les gonades telles que l'hormone lutéinisante et l'hormone folliculo-stimulante (Seeburg et al., 1987). La GnRH agit comme neurotransmetteur dans le cerveau au niveau de certains réseaux neuronaux liés aux comportements reproducteurs (Wirsig-Wiechmann, 2001).

La GnRH existe sous plusieurs formes structurellement distinctes chez les Vertébrés. Une même espèce peut posséder deux à trois formes différentes de GnRH ayant probablement différentes fonctions. Toutes les formes de GnRH sont composées de 10 acides aminés. Le N-terminal pyroglutamyl modifié et le C-terminal amidé sont les séquences moléculaires conservées dans toutes les formes alors que la variation structurale la plus commune se trouve au niveau des positions 5 à 8 (Parhar, 2002). Ces formes peuvent être généralement catégorisées en trois groupes principaux basés sur leur localisation finale: GnRH1 pour la population hypothalamique, GnRH2 pour la population mésencéphalique, et GnRH3 (seulement retrouvée chez les poissons) pour la population télencéphalique-nerf terminal (Parhar, 2002; Whitlock,

2005). Chez l'opossum, la présence de GnRH1 - dite de poulet, car elle y a été initialement découverte - et de GnRH2 a été observée (King et al., 1990).

1.4.2. Localisation des neurones GnRH

Chez les mammifères, il existe deux types de neurones synthétisant la GnRH dans le cerveau antérieur : ceux de la population hypothalamique et ceux associés au nerf terminal (Kawamura & Kikuyama, 1998; Parhar, 2002). Les neurones exprimant la GnRH de la population hypothalamique sont distribués de façon diffuse dans le diencephale, se situant en majorité dans les régions septo-préoptiques sous la forme de regroupements lâches, mais avec quelques-uns dispersés dans l'hypothalamus basal (Parhar, 2002). Dans le télencéphale, les neurones synthétisant la GnRH peuvent aussi se retrouver dans les tubercules olfactifs, le tractus et le noyau de la bande diagonale de Broca, le septum médian et les aires préoptiques. Également, tel que mentionné plus haut, un sous-ensemble des neurones du nerf terminal exprime la GnRH et peut se retrouver dans la cavité nasale et dans les ganglions terminaux. Dans ces derniers, les corps cellulaires exprimant la GnRH sont de plus faible diamètre et se localisent plus en périphérie (Zheng et al., 1990; Wirsig-Wiechmann et Wiechmann, 2002).

Les fibres exprimant la GnRH sont caractérisées par la présence de varicosités. Chez les rongeurs, l'innervation de la région nasale par ces fibres est similaire à celle décrite pour le nerf terminal. Chez le rat, on retrouve aussi la présence des terminaisons en « paniers » exprimant la GnRH à proximité des acini glandulaires et des canaux excréteurs des glandes antérieures médiales (glandes présentes chez le rat et la souris) (Zheng et al., 1988). Chez le campagnol seulement, des neurones et des fibres exprimant la GnRH ont été observés dans le ganglion ptérygopalatin ainsi que des terminaisons en « paniers » encerclant les neurones postganglionnaires qui participent au contrôle autonome du mécanisme de pompe vasculaire de l'organe voméronasal (Wirsig-Wiechmann & Lepri, 1991).

Chez les rongeurs, l'innervation de l'OB par les fibres exprimant la GnRH est clairsemée. Un petit nombre de ces fibres rentre dans l'OB et termine dans la couche plexiforme externe. Par contre, la couche glomérulaire de l'AOB est innervée par un plexus dense de fibres exprimant la GnRH et des évidences suggèrent qu'il y a des contacts synaptiques. Les fibres sont aussi observées adjacentes au tractus olfactif dans la région recevant les informations chimiosensorielles de l'AOB (Zheng et al., 1988). Tout comme des fibres du nerf terminal, quelques fibres exprimant la GnRH peuvent sortir de la surface du pédoncule pour aller s'associer à une branche de l'artère cérébrale antérieure. D'autres fibres atteignent l'amygdale et le noyau interpédonculaire (Jennes, 1987). Cependant, les fibres exprimant la GnRH se distribuent de manière importante dans l'éminence médiane et les régions hypophysaires de l'hypothalamus. D'autres axones exprimant la GnRH se retrouvent dans l'organe vasculaire de la lame terminale et l'aire préoptique médiale (Schwanzel-Fukuda et al., 1988).

Chez l'opossum adulte, l'innervation périphérique des cellules exprimant la GnRH est semblable à celle du nerf terminal. La figure 6 illustre les cellules et les fibres exprimant la GnRH localisées le long du nerf terminal de la périphérie aux régions centrales (Zheng et al., 1990). En périphérie, plusieurs fibres exprimant la GnRH se trouvent le long du septum nasal sous forme de plexus lâche avec le nerf voméronasal. Par contre, peu de corps cellulaires synthétisant la GnRH se trouvent dans cette région du nerf terminal. Les fibres voméronasales exprimant la GnRH traversent la lame criblée jusqu'à la surface médiale des OB (Zheng et al., 1990).

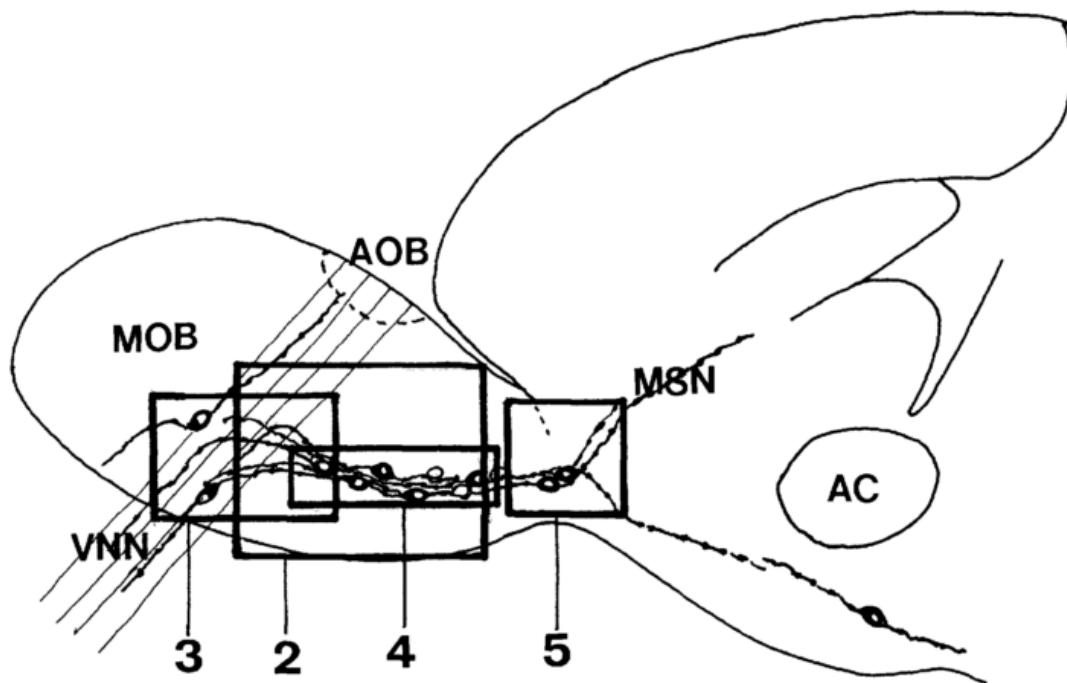


Fig 6. Schéma du cerveau antérieur de l'opossum *Monodelphis domestica* adulte en coupe parasagittale. Les cellules exprimant la GnRH sont représentées par des cercles formés de lignes noires solides alors que les fibres sont en lignes pointillées. AC, commissure antérieure; AOB, bulbe olfactif accessoire; MOB, bulbe olfactif principal; MSN, noyau septal médian; VNN, nerf voméronasal. (Tiré de Zheng et al., 1990)

Contrairement aux rongeurs, Schwanzel-Fukuda et al. (1988) ont noté qu'il n'y a pas de neurones ou de fibres synthétisant la GnRH dans l'AOB. D'ailleurs, aucune fibre exprimant la GnRH n'est associée au nerf voméronasal au niveau de la surface médiale de l'OB pour rejoindre l'AOB.

Dans le ganglion terminal, des contacts synaptiques sont observés entre des terminaisons axoniques n'exprimant pas la GnRH et les corps cellulaires synthétisant la GnRH ou parfois des dendrites exprimant la GnRH. Occasionnellement, il y a contact synaptique entre les terminaisons axoniques exprimant la GnRH et les dendrites n'exprimant pas la GnRH (Zheng et al., 1990).

Les fibres exprimant la GnRH quittant le ganglion terminal vers le SNC sont regroupées en un faisceau épais facilement reconnaissable. Ce faisceau se dirige vers la région médiale du noyau olfactif antérieur (Schwanzel Fukuda et al., 1988). Par la suite, une partie du faisceau longe l'hippocampe antérieur et le septum médian pour s'embrancher sur les cellules du noyau triangulaire du septum tandis que quelques fibres poursuivent leur trajet dans la région dorsale de la commissure hippocampale dans la strie médiane de Lancisi. D'autres fibres s'étendent jusqu'à l'organe subfornical pour s'embrancher dans l'épendyme. La majeure partie des fibres s'arquent toutefois le long du noyau triangulaire du septum pour continuer ventralement le long de la courbe rostrale de la commissure antérieure pour s'étendre dans l'aire préoptique médiale, d'une part, et, d'autre part, dans le noyau septal médial où elles s'arborescent entre les cellules de ce noyau. Les fibres exprimant la GnRH sont aussi observées dans l'aire paraolfactive médiale, le noyau et le tractus de la bande diagonale, le tubercule olfactif, la région hypothalamique antérieure et parmi les cellules du noyau supraoptique.

Des corps cellulaires de neurones synthétisant la GnRH sont observés dans les régions du diencephale mentionnées plus haut. Toutefois, aucune cellule n'est observée dans les régions « tubérales » ni dans les régions caudales de l'hypothalamus chez l'opossum *M. domestica* (Schwanzel-Fukuda et al., 1988). Chez cette espèce, les fibres exprimant la GnRH sont observées dans les mêmes régions du diencephale que chez les rongeurs. Quelques fibres sont toutefois rapportées dorsalement et caudalement au chiasma optique, dans l'hypothalamus basal médial, et dans la capsule du corps mamillaire.

1.4.3. Migration des neurones GnRH

Les neurones synthétisant la GnRH sont caractérisés par une migration unique : ils sont produits par la placode olfactive, en périphérie, et rejoignent l'hypothalamus tôt durant l'embryogenèse (Wiernan et al., 2011). Plusieurs études décrivent en détail la migration de ces cellules GnRH, mais le substrat sur lequel les neurones GnRH

migrent est encore mal identifié. Le nerf terminal est un des substrats proposés pour soutenir cette migration chez les marsupiaux (Schwanzel-Fukuda & Silverman, 1980; Schwanzel-Fukuda et al., 1985). Chez les rongeurs, les neurones GnRH migreraient dans le cerveau antérieur le long d'un mélange de fibres voméronasales et olfactives (Tobet et al., 1992; Wray, 2010; Wieman et al., 2011). Il faut cependant se rappeler qu'il est difficile de distinguer les fibres du nerf terminal de celles olfactives et voméronasales chez ces espèces.

Chez l'opossum, Schwanzel-Fukuda et al. (1988) ont étudié le patron de migration des cellules synthétisant la GnRH à différents âges néonataux en utilisant des techniques immunohistochimiques. Chez le nouveau-né, les cellules synthétisant la GnRH sont situées dans un petit amas dorsal au VNO dans la partie ventrocaudale du septum nasal, dispersées le long des fibres olfactives et voméronasales, dans la lame criblée et dans le ganglion terminal. Les fibres exprimant la GnRH sont observées dans ces régions, mais, à partir du ganglion terminal, elles s'étendent le long des portions médianes du télencéphale jusqu'à l'épendyme du 3^e ventricule. Quelques cellules exprimant la GnRH sont observées dans l'hypophyse antérieure. Aucune présence d'immunoréactivité pour GnRH n'est rapportée dans l'OB ou dans l'AOB lors du développement. À partir de P6, les fibres exprimant la GnRH s'étendent plus ventralement et caudalement vers l'organe subfornical primordial. À cet âge, des cellules et des fibres exprimant la GnRH se retrouvent dans le tubercule olfactif et dans le septum, avec quelques fibres se distribuant dans l'éminence médiane. À P8, les cellules et les fibres exprimant la GnRH se retrouvent dans les régions décrites précédemment, mais en plus grand nombre. Les fibres exprimant la GnRH descendent le long de la commissure antérieure, au niveau de la région précurseur du noyau triangulaire du septum, pour atteindre la région préoptique et la bande diagonale de Broca. Des fibres sont aussi observées dans l'organe vasculaire de la lamina terminalis, dans le nerf optique caudal et ventral, dans l'hypothalamus médian basal et dans l'éminence médiane. De P10 à P12, la localisation des cellules et des fibres exprimant la GnRH est similaire à P8. Le développement du système GnRH n'est toutefois pas encore fini si l'on compare au patron observé chez l'adulte.

Cummings et Brunjes (1995) ont étudié la relation entre le patron de migration des neurones synthétisant la GnRH chez l'opossum néonatal et la présence de fibres exprimant S-100 (un facteur neurotrophique trouvé dans les cellules de Schwann et les astrocytes) et GFAP. De P0 à P5, les cellules exprimant S-100 sont en étroite association avec les neurones synthétisant la GnRH. De P0 à P20, les fibres exprimant S-100 sont observées en étroite association avec les fibres exprimant la GnRH décrites par Schwanzel-Fukuda et al. (1988) et correspondent aux endroits associés aux fibres du nerf terminal. GFAP a été également observé dans la même location que le marqueur S-100. La distribution temporelle et spatiale du marqueur S-100 dans les fibres étroitement associées avec les neurones et fibres exprimant la GnRH, ainsi que leur localisation dans les régions du nerf terminal, laissait entrevoir la possibilité d'un rôle dans le guidage de la migration des neurones synthétisant la GnRH. Cummings et Brunjes (1995) ont suggéré que les cellules observées associées aux fibres seraient des cellules engainantes puisqu'elles expriment la forme gliale de la protéine S-100 et GFAP.

1.5. Problématique

La présence d'un faisceau de fibres relativement matures, car exprimant NF200, qui relie les bulbes olfactifs au télencéphale chez l'opossum nouveau-né (Adadja et al., 2013) laisse planer un doute sur l'immaturité du système olfactif. Plusieurs études suggèrent que quelques fibres matures seraient suffisantes pour que le système olfactif soit assez fonctionnel pour guider le nouveau-né. Il est donc important d'investiguer ce faisceau de fibres relativement mature.

L'objectif de mon projet de maîtrise était d'étudier plus en détail le développement du faisceau de fibres nerveuses exprimant NF200 reliant les bulbes olfactifs à la lame terminale chez l'opossum néonatal. J'ai aussi étudié la migration et la distribution des cellules et des projections GnRH. En effet, il a été démontré chez plusieurs espèces de mammifères que les cellules exprimant la GnRH sont produites au niveau de la placode nasale embryonnaire, puis qu'elles migrent lors du développement jusqu'au

système nerveux central, dans lequel elles pénètrent pour atteindre leur localisation finale au niveau de l'hypothalamus. Cette migration fait consensus, mais pas la nature du substrat qui la permet. Des auteurs ont suggéré, sans toutefois l'avoir démontré, que le substrat principal serait en fait un sous-groupe de fibres du nerf terminal (Schwanzel-Fukuda et al., 1988; Whitlock, 2004). Une autre étude suggère plutôt que le substrat sur lequel migrent les neurones GnRH sont des cellules gliales olfactives (Cummings & Brunjes, 1995).

Mes hypothèses de travail sont les suivantes :

- 1) Les fibres marquées au NF200 sont associées à la migration des cellules synthétisant le GnRH et seraient le substrat sur lequel se déplacent les cellules.
- 2) Les fibres marquées au NF200 appartiennent au système du nerf terminal.

Pour déterminer si le fascicule marqué au NF200 observé à la naissance chez l'opossum est associé à la migration des neurones GnRH et à la croissance de leurs axones, nous avons utilisé la double immunohistochimie contre NF200 et GnRH1 afin d'observer la localisation et la distribution des cellules GnRH et de ses projections.

2. Matériel et méthodes

2.1. Animal

Les opossums *Monodelphis domestica* proviennent d'un élevage maintenu au Département de Sciences biologiques selon les directives habituelles pour cet animal (Fadem et al., 1982; Kraus et Fadem, 1987; VandeBerg et Williams-Blanguero, 2010). Les opossums sevrés disposent d'une cage individuelle, et la nourriture et l'eau sont fournies *ad libitum*. Les femelles sont hébergées dans une salle à part des mâles, car l'œstrus chez la femelle est induit par la présence du mâle. Dans des conditions en laboratoire, l'opossum peut se reproduire à longueur d'année. Pour les accouplements, le mâle et la femelle sont placés dans une grande cage d'accouplement muni d'une grille de séparation afin que le mâle et la femelle s'habituent l'un à l'autre. Cette période sans contact permet de diminuer le taux de blessures et de fatalités tout en permettant à la femelle d'entrer en œstrus. Au bout de 5 jours, la grille de séparation est retirée et les opossums sont laissés libres de contact pour une autre période de 5 jours avant d'être séparés et remis dans leur cage respective. Pendant les 14 jours (le temps de gestation) suivant la séparation, la présence de petits sur le ventre de la femelle est vérifiée quotidiennement. Les premières 24h après la naissance sont considérées comme le jour postnatal 0 (P0).

2.2. Préparation des spécimens

Toutes les procédures sont conformes aux lignes directrices du National Institutes of Health et du Conseil canadien de protection des animaux. Elles ont été approuvées par le comité de déontologie de l'expérimentation sur les animaux (CDEA) de l'Université de Montréal.

Vingt opossums néonataux (3 P0, 3 P2, 4 P6, 4 P11 et 6 P15) ont été utilisés au cours de l'étude. Le protocole était le suivant : chaque animal est anesthésié profondément par hypothermie à -20°C pendant au moins 5 min, jusqu'à ce qu'il soit insensible à des stimulations tactiles (pincement des pattes et de la queue). Il est alors décapité rapidement et la tête fixée par immersion dans une solution de paraformaldéhyde (2% dans du tampon phosphate salin (PBS) 0,1 M). La peau ainsi que les os de l'arrière du

crâne sont retirés et les tissus maintenus dans le fixateur à 4°C pour une durée variant entre 24 et 48h avant d'être immergés dans une solution de sucre 30% (dans PBS) à 4°C pendant 24h. Cette étape est nécessaire pour cryoprotéger les tissus en vue de l'embloquage et de la coupe. Les tissus sont ensuite embloqués dans du Tissue-Tek OCT Compound (Miles Scientific) et les blocs solidifiés avec de la glace carbonique afin de les congeler rapidement. Ils sont conservés à -80°C en attendant d'être sectionnés, transversalement ou sagittalement, en coupe de 20 µm d'épaisseur avec un cryostat (CM3050S Leica).

2.3. Immunohistochimie

Les anticorps primaires utilisés dans cette étude sont un anticorps polyclonal lapin-anti-NF200 (Sigma) et un anticorps monoclonal souris-anti-GnRH1 (EMD Millipore). Le neurofilament 200 KDa (NF200) est un filament intermédiaire neuronal, le neurofilament à chaîne lourde. Avec le neurofilament à chaîne légère et le neurofilament à chaîne moyenne, ils forment notamment le cytosquelette des neurones. La présence de NF200 est utilisée, entre autres, pour évaluer le niveau de développement de certaines régions du cerveau (Pundir et al., 2012). En effet, le NF200 est le dernier neurofilament à être exprimé durant la maturation. L'anticorps polyclonal anti-NF200 utilisé est dirigé contre le NF200 provenant de moelle épinière bovine qui est identique à au moins 70% avec celui de *Monodelphis domestica*. L'anticorps a été utilisé précédemment chez l'opossum avec succès (Adadja et al., 2013).

L'anti-GnRH1 est dirigé contre l'épitope situé dans le N-terminal de la forme mammalienne du GnRH1 (QHWSYGLRPG). La séquence de la protéine complète GnRH1 de souris montre 70% d'identité avec celle de *Monodelphis domestica*, mais la séquence de l'épitope est identique à 100% entre les deux espèces. Des études précédentes s'intéressant aux GnRH chez *Monodelphis domestica* ont utilisé un antisérum dont le déterminant antigénique est le 2-4 et 7-10 acides aminés de l'immunogène (EHWSYGLRPG) (Schwanzel-Fukuda et al., 1988).

Pour la double immunohistochimie au NF200 et GnRH1, les lames sont d'abord hydratées pendant 20 min avec du tampon TBST (Tris (0,05M), NaCl (1,5%) et Triton x-100 (0,3%)). Par la suite, elles sont incubées toute la nuit dans du TBST contenant 5% de Normal Goat Serum (NGS, Fisher) contenant l'anticorps primaire NF200 (concentration : 1:100) et l'anticorps anti-GnRH1 (1:500). Après trois rinçages de 20 min dans du TBST, les lames sont incubées pendant 2h dans du TBST (5% NGS) contenant l'anticorps secondaire chèvre anti-lapin couplé à Alexa 488 (1:400; Invitrogen) et l'anticorps secondaire chèvre anti-souris Cy3 (1:400; Jackson Immunoresearch). Cette 2^e incubation est suivie d'un rinçage de 20 min avec du TBST seul, puis 2 rinçages avec du TBST et quelques gouttes de HCl. Une fois les lames sèches, elles sont recouvertes d'une lamelle en utilisant le Fluoromount (SouthernBiotech) comme milieu de montage. Des coupes contrôles ont été faites en omettant les anticorps primaires à l'étape concernée (Fig. 7).

Les lames sont visualisées avec un microscope à fluorescence (Olympus BX51 ou Nikon Eclipse E3600) en utilisant des filtres spécifiques pour la fluorescence : dans le vert pour l'Alexa-488 (excitation 450–490 nm, émission 520 nm) et dans le rouge pour le Cy3 (excitation 510–560 nm, émission 590 nm). Une caméra digitale (Qimaging ou DXM1200) reliée à un ordinateur équipait ce microscope. Les photos digitales ont été acquises grâce au programme Qcapture Pro. Les photos ont été traitées avec le logiciel Image Pro Plus pour convertir le marquage rouge en magenta et le marquage vert en cyan et pour fusionner les photos ensemble. Les photomontages et les reconstructions de type « camera lucida » ont été réalisés à l'aide des logiciels CorelDraw et Corel PhotoPaint.

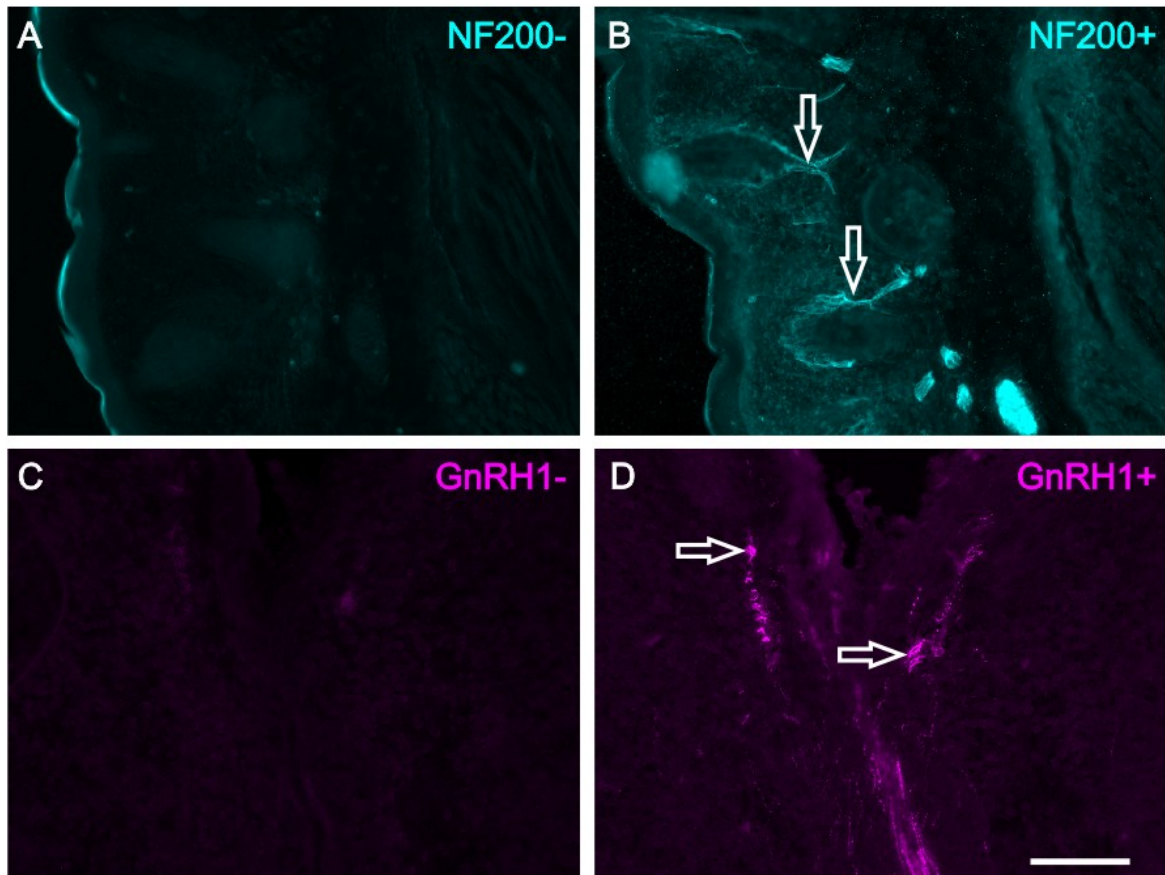


Fig 7. Coupes adjacentes de cerveau d'opossum nouveau-né (A avec B, C avec D) traitées avec les anticorps secondaires et soit l'anticorps primaire anti-NF200 (B), soit l'anticorps primaire anti-GnRH1 (D). Les microphotographies des coupes contrôles A et C ont été prises à des temps d'exposition semblables à B et D respectivement. Le marquage au NF200 est en cyan (flèches en B) et le marquage au GnRH1 est en magenta (flèches en D). Échelle = 100 μ m.

3. Résultats

Puisque la vérification de la présence des petits est effectuée une fois par jour, il existe une variation de plusieurs heures en termes d'âges entre des spécimens d'un même jour postnatal. Ainsi, le marquage NF200 et GnRH1 n'est donc pas identique d'un spécimen à l'autre; il se peut qu'une région exprime un tel marquage chez un spécimen alors qu'il est absent chez un autre. Par contre, les résultats reportés ci-dessous sont ceux observés chez la majorité des spécimens du même jour postnatal, indiquant ainsi que le marquage commence autour de cet âge.

3.1 Marquage NF200 associé aux faisceaux de fibres précoces

Chez l'opossum, au jour de la naissance, les fibres marquées au NF200 sont observées le long du septum nasal. Elles convergent médialement et dorsalement vers les ganglions du nerf terminal. Ces fibres courent ventralement le long de ces ganglions vers l'extrémité médiale pour remonter presque le long de la ligne médiale et pénétrer dans la bordure ventromédiale des OB (en cyan sur la Fig. 9). Ces fibres poursuivent leur chemin médialement jusqu'à la lame terminale, passant près de l'hippocampe présomptif (Fig. 8A, 9). À P2, les fibres exprimant le NF200 sont plus nombreuses dans les régions observées à P0 (Fig. 8B, 9), mais sont également retrouvées plus caudalement, atteignant la région présomptive du septum médial. Seules quelques fibres descendent toutefois vers la bande diagonale de Broca. À P6, davantage de fibres marquées au NF200 se retrouvent dans les régions décrites précédemment (Fig. 8C, 9), avec quelques fibres plus proches des régions hypothalamiques présomptives. À cet âge, quelques fibres marquées au NF200 sont également observées dans la région préoptique et le chiasma optique (Fig. 10A). Ces fibres, probablement optiques, remontent dans la région du tractus optique jusqu'au niveau du noyau géniculé latéral (Fig. 10B). À P11, il n'y a pas de différences notables avec le patron observé à P6 (Fig. 9). À P15, il n'y a plus de marquage NF200 aux niveaux où se trouvaient les fibres s'étendant des ganglions terminaux jusqu'aux régions hypothalamiques ventrales. Seules les fibres situées dans le chiasma optique, le tractus optique et le noyau géniculé latéral sont marquées au NF200 (Fig. 9, 10C-D). À tous les âges, sauf à P15 donc, la localisation des fibres marquées au NF200 correspond à la voie du nerf terminal.

3.2 Marquage GnRH1 associé au faisceau de fibres précoces

Au niveau du septum nasal, des ganglions terminaux et de l'encéphale, les fibres exprimant la GnRH1 chez les opossums de P0 à P11 sont étroitement associées aux fibres exprimant le NF200 (Fig. 8, 9). À P0, quelques fibres marquées au GnRH1 sont observées le long du septum nasal avec un plus grand nombre dans la portion dorsale du septum. Ces fibres empruntent le même trajet du ganglion terminal jusqu'à la lame terminale que celles exprimant le NF200 (Fig. 8A, 9). À P2, les fibres marquées au GnRH1 sont plus nombreuses dans les régions observées à P0. Comme les fibres exprimant le NF200, elles se retrouvent plus caudalement dans la région présomptive de l'hippocampe ainsi que vers la bande diagonale de Broca. Toutefois, contrairement aux fibres positives pour NF200, les fibres exprimant la GnRH1 se prolongent ventralement; une ou deux d'entre elles pouvant atteindre l'éminence médiale. À P6, les fibres exprimant la GnRH1 sont encore plus nombreuses qu'aux âges précédents dans les régions décrites. De plus, en périphérie, des fibres marquées au GnRH1 sont observées clairement aux alentours des organes voméronasaux (Fig. 9, 11A-B) et le long du septum nasal en direction des ganglions terminaux et des OB (Fig. 9). Au niveau central, les fibres exprimant la GnRH1 se prolongent plus ventralement dans la bande diagonale de Broca. Certaines sont observées au-dessus du chiasma optique et longeant le tractus optique; ces deux structures sont aisément reconnaissables parce que les fibres visuelles expriment le NF200 (Fig. 10). À P11, il y a peu de changement par rapport à P6 sinon que plus de fibres marquées sont observées, particulièrement au niveau de l'éminence médiale (Fig 11C-D). À P15, les fibres exprimant la GnRH1 se retrouvent dans les régions décrites aux âges précédents. Dans l'OB, une ou deux fibres exprimant la GnRH1 sont parfois observées dans les régions périphériques ventrolatérales et dorsoventrales; il n'y a aucune fibre NF200 associée à ces fibres. Les fibres exprimant la GnRH1 sont observées dans les régions du septum médial, en dessous de l'organe subfornical, et descendent même jusqu'en dessous du troisième ventricule. Comme à P11, du marquage GnRH1 est observé dans et en périphérie du chiasma optique ainsi que le long du tractus optique. Il y a beaucoup de fibres exprimant la GnRH1 dans les régions hypothalamiques (région postérieure hypothalamique, région latérale hypothalamique, région ventromédiale

hypothalamique). On observe beaucoup de fibres dans le noyau hypothalamique arqué et dans l'éminence médiale.

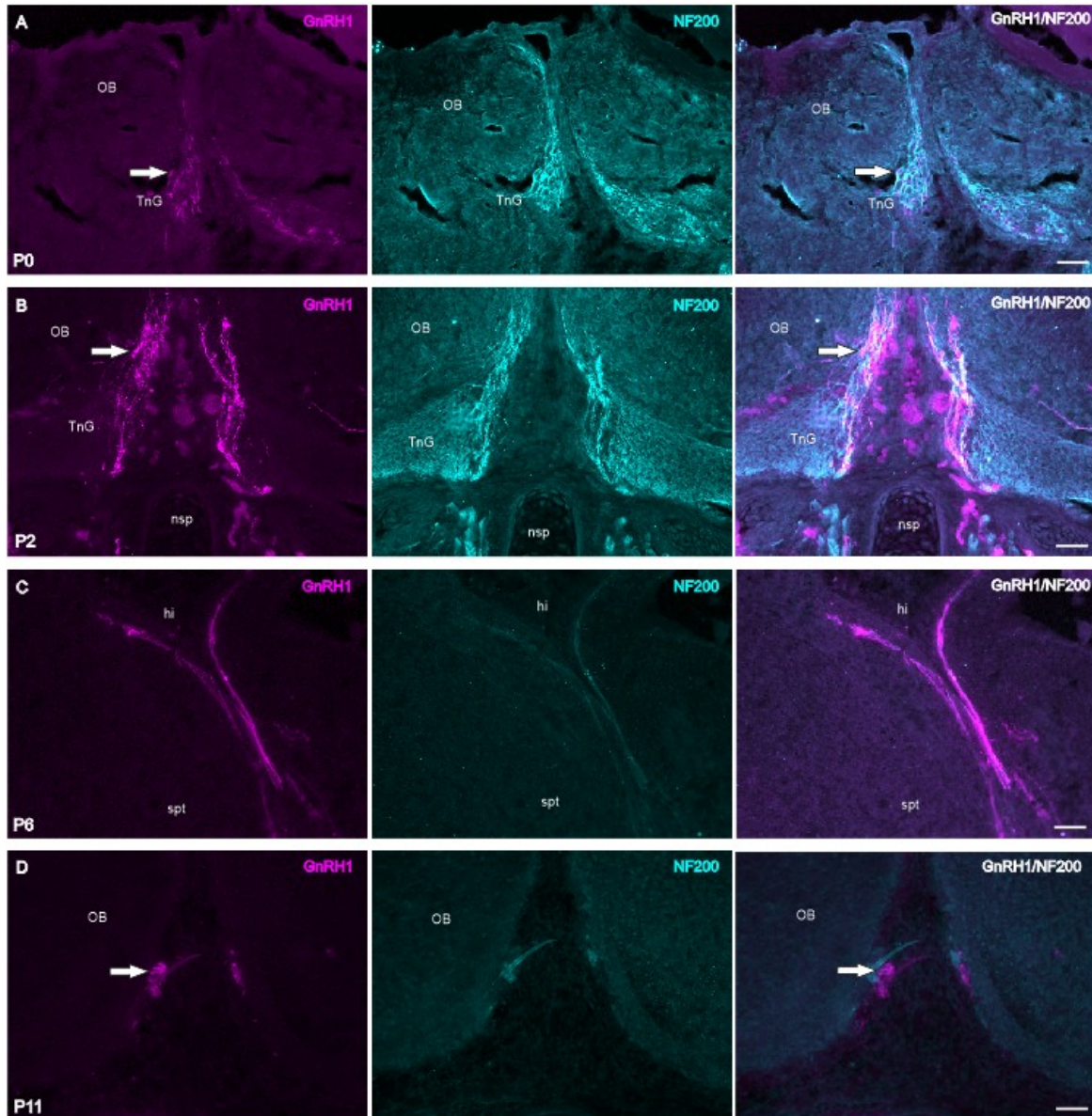


Fig 8. Coupes transverses de têtes d'opossum à P0 (A), P2 (B), P6 (C) et P11 (D). Le marquage au GnRH1 est représenté en magenta (colonne de gauche), le marquage au NF200 est en cyan (colonne du centre), et la superposition des deux marquages apparaît en blanc (colonne de droite). Les flèches pointent des corps cellulaires de cellules marquées pour GnRH1. Dorsal est vers le haut. OB, bulbe olfactif; hi, hippocampe présumptif; nsp, septum nasal; spt, régions septales présumptives. Échelle = 100 μ m.

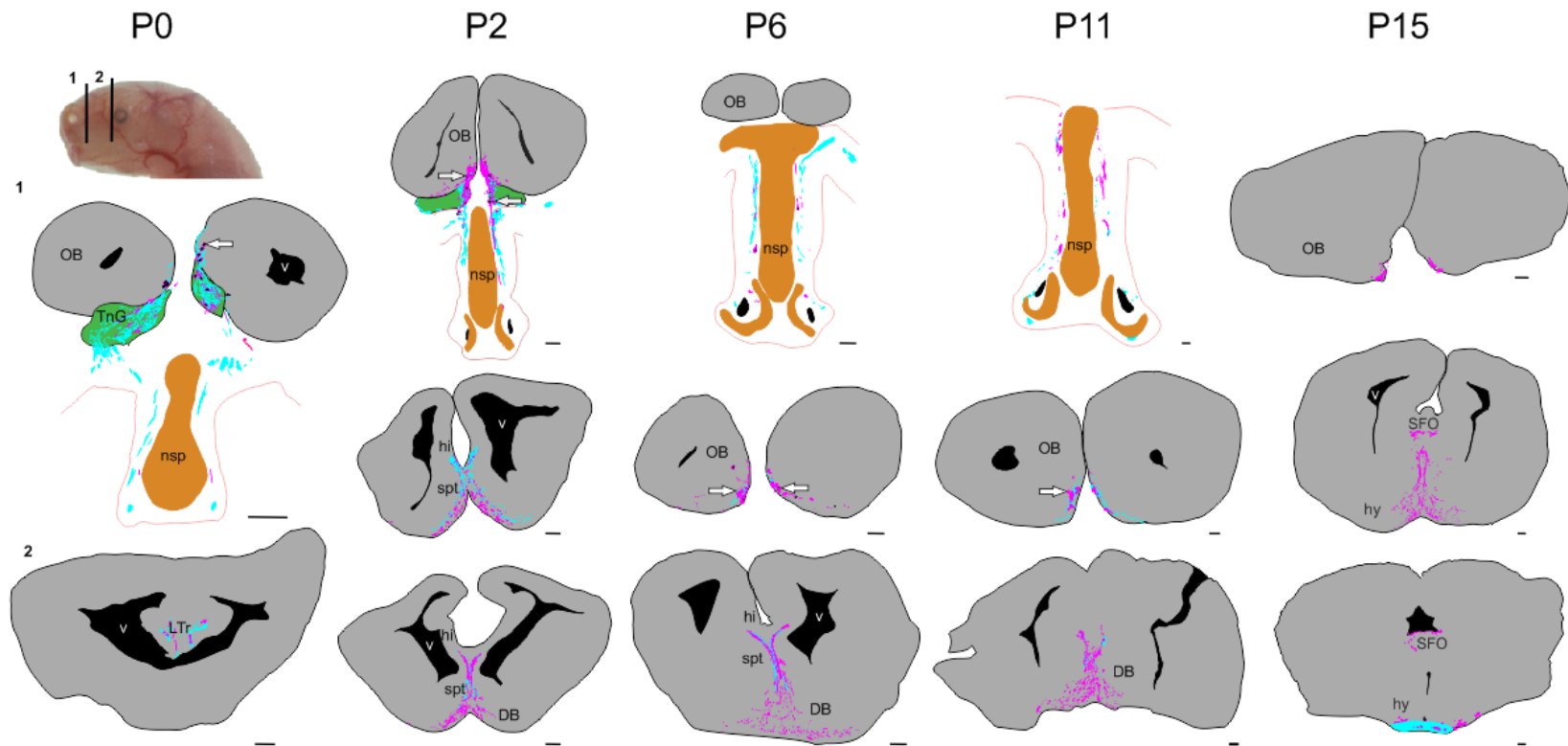


Fig 9. Coupes transverses de têtes d'opossum illustrant le marquage NF200 (cyan) et GnRH1 (magenta) à différents âges. Les sections s'étendent du septum nasal à l'hypothalamus (de haut en bas) pour chaque âge. Les flèches pointent des cellules synthétisant du GnRH1. En gris, le système nerveux central; en vert, le ganglion du nerf terminal; en orange, le cartilage; en rose, la muqueuse nasale. OB, bulbe olfactif; DB, bande diagonale de Broca; hi, hippocampe présumptif; hy, régions hypothalamiques; LTr, lame terminale; nsp, septum nasal; sfo, organe subfornical; spt, région septale présumptive; TnG, ganglion du nerf terminal; v, ventricule. Échelles = 100 μ m.

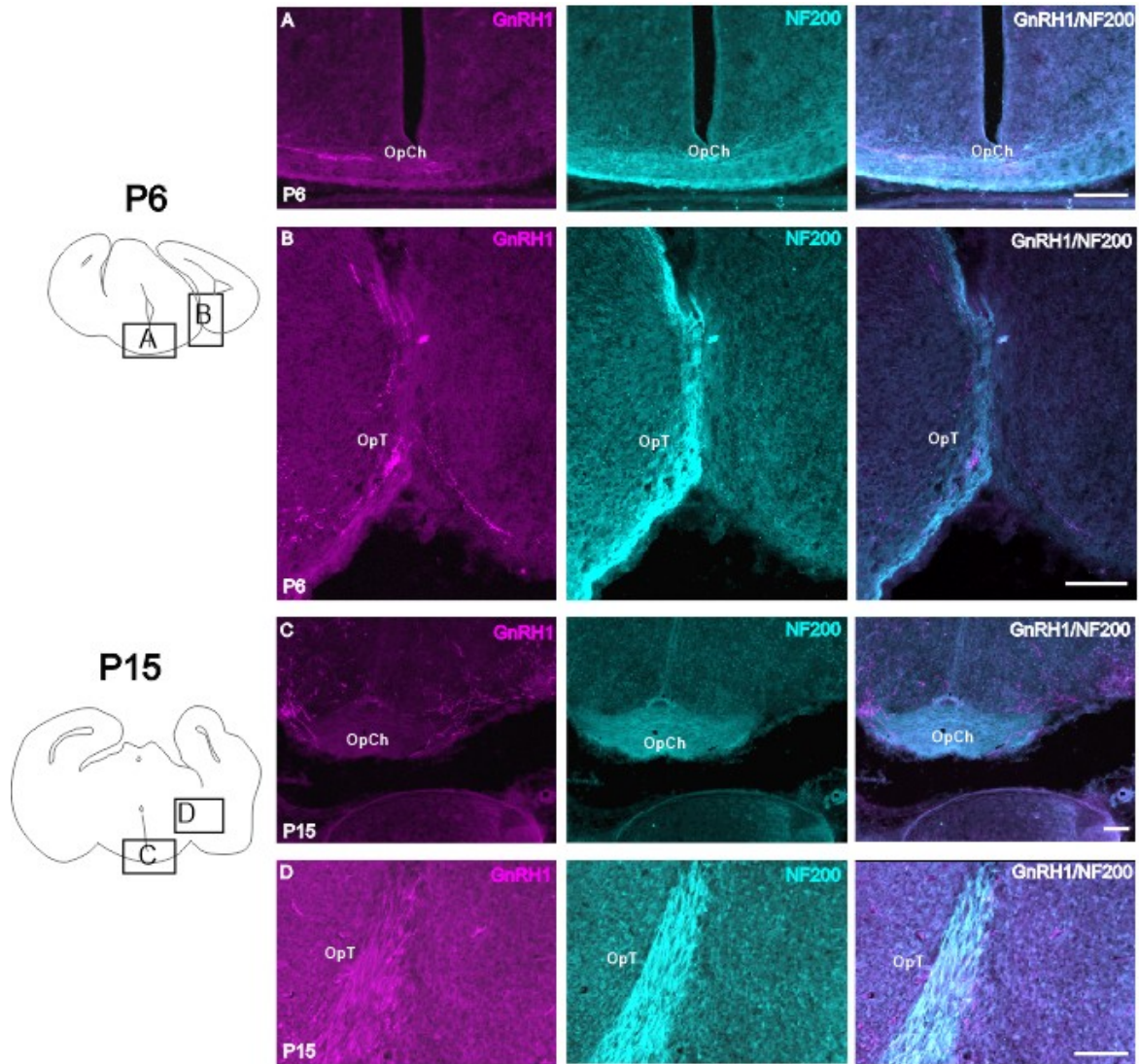


Fig 10. À droite, microphotographies de coupes transverses de cerveau d'opossums à P6 (A, B) et P15 (C, D) montrant le marquage GnRH (magenta, colonne de gauche), NF200 (cyan, colonne du centre) et les deux superposés (colonne de droite). Les rangées B et C correspondent à la région du chiasma optique, et les rangées A et D aux voies optiques. La localisation des photos est indiquée approximativement par des carrés sur les schémas de gauche. Dorsal vers le haut. OpCh, chiasma optique; Opt, tractus optique; hi, hippocampe présumé; nsp, septum nasal; spt, région septale présumptive. Échelles = 100 μ m.

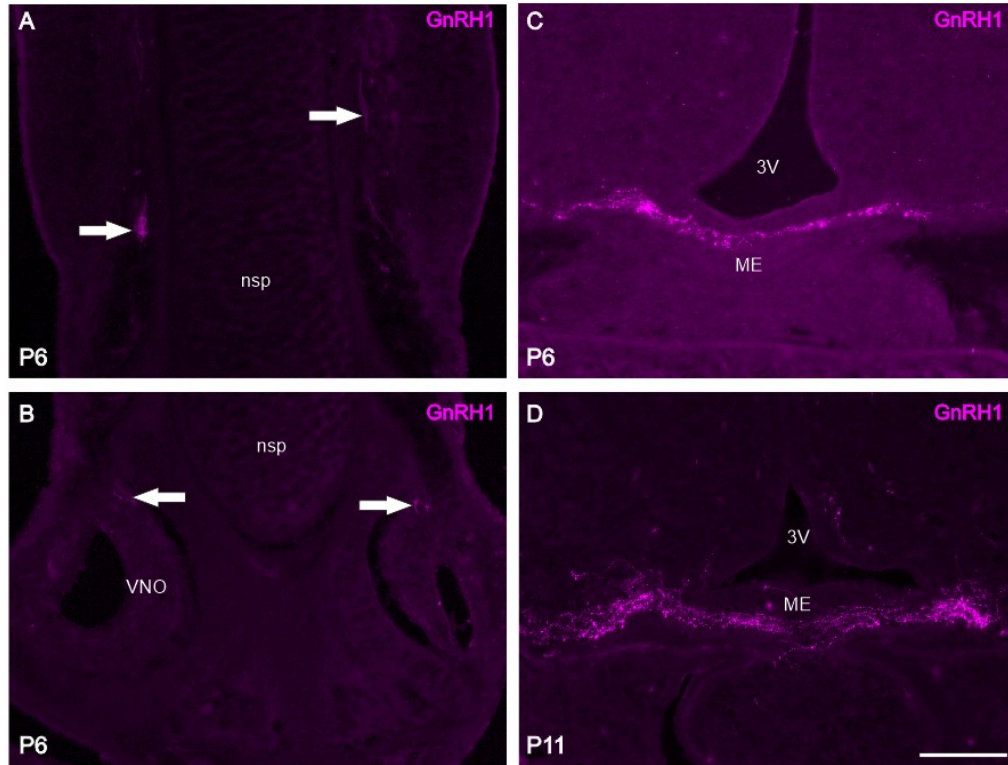


Fig 11. Coupes transverses de têtes d'opossum montrant le marquage GnRH1 (magenta) au niveau du VNO et du septum nasal à P6 (A,B) ainsi qu'au niveau de l'éminence médiale à P6 (C) et P11 (D). Les flèches pointent les fibres marquées au GnRH1. Dorsal est vers le haut. 3v, troisième ventricule; nsp, septum nasal; ME, éminence médiale; VNO, organe voméronasal. Échelle = 100 μ m.

3.3 Cellules exprimant la GnRH1

Les corps cellulaires exprimant GnRH1 peuvent être observés en petits groupes dans le septum nasal dorsal, l'extrémité médiale du ganglion du nerf terminal et le long de la périphérie ventromédiale de l'OB en association avec les fibres GnRH1 à P0 et à P2 (Fig. 8A-B, 9, 12A). Ils sont peu nombreux. Leur nombre augmente par la suite dans l'OB et à partir de P6, des cellules exprimant la GnRH1 sont observées dans les régions ventrales du septum nasal, dorsalement au VNO (Fig. 12B). La quantification du nombre de cellules n'a pas été effectuée car des contraintes méthodologiques (épaisseur des coupes, intensité de la fluorescence de fond) font en sorte que nous n'avons pu établir de critères réellement objectifs de mesure. À P11, on remarque peu de corps cellulaires exprimant la GnRH1 entre le septum nasal et les ganglions terminaux. Les cellules se retrouvent principalement dans l'OB et sont entourées par

les fibres exprimant la GnRH1. À P15, les cellules se retrouvent sensiblement aux mêmes endroits qu'à P11. Dans un seul spécimen, une cellule a été observée dans les régions septales présomptives. À tout âge, les cellules ne sont pas retrouvées dans les régions plus caudales (bande diagonale de Broca et régions hypothalamiques).

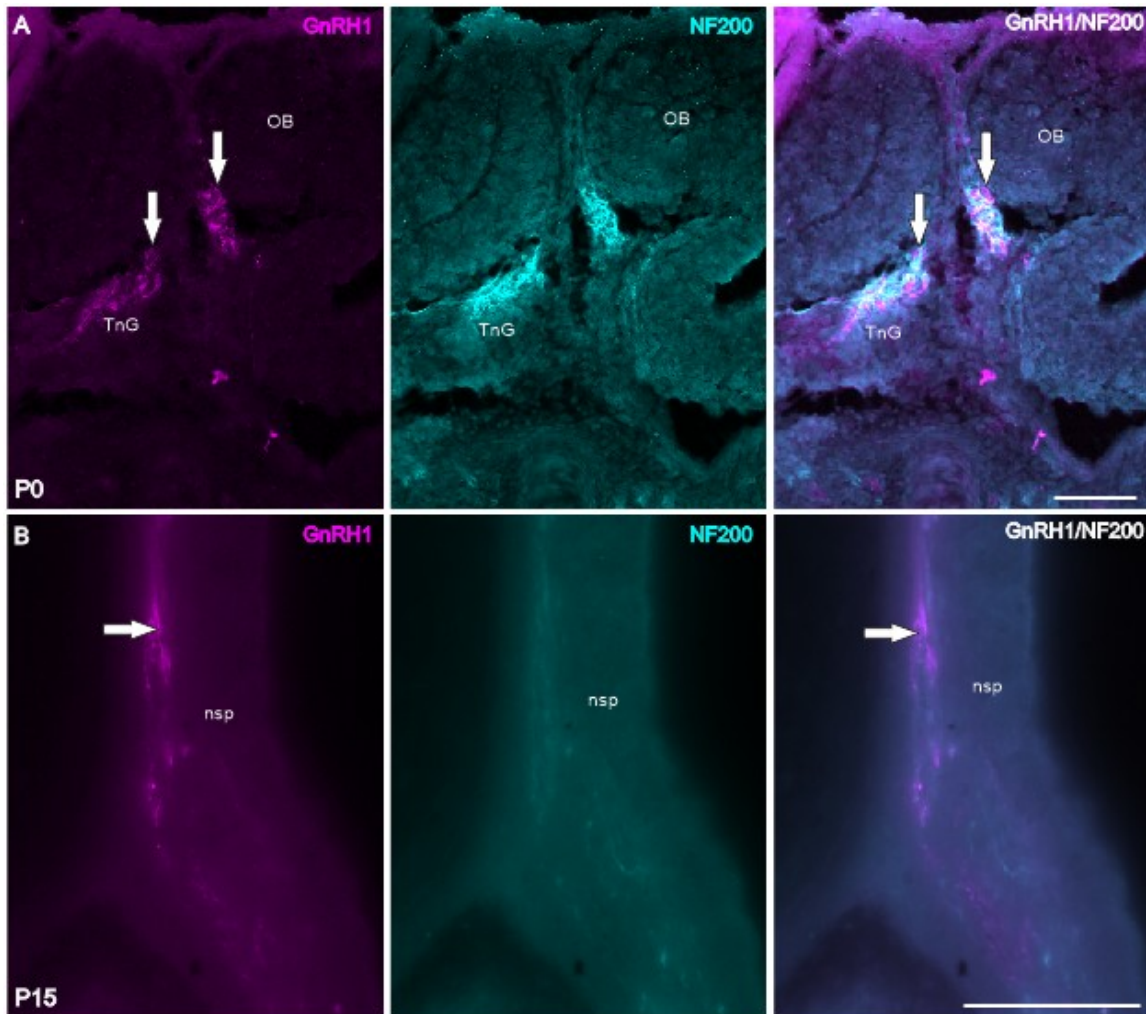


Fig 12. Coupes transverses au niveau du septum nasal d'opossums à P6 (A) et P15 (B) montrant des corps cellulaires (flèches) exprimant la GnRH1. Les fibres marquées au GnRH1 (magenta) et NF200 (cyan) accompagnent ces cellules dans le ganglion terminal et le bulbe olfactif. Nsp, septum nasal; OB, bulbe olfactif; TnG, ganglion terminal. Dorsal est vers le haut. Échelles = 100 μ m.

3.4 Expression du GnRH1 dans des glandes nasales

Des glandes situées dans le méat inférieur nasal marquées au GnRH1 ont été observées à partir de P6 (Fig. 13). À P2, les glandes ne sont pas encore présentes. Des fibres exprimant le NF200 aux alentours des unités sécrétrices sont présentes, ce qui suggère une innervation. Il y a la possibilité que le marquage GnRH1 soit un artéfact, car les anticorps secondaires ont tendance à se fixer dans les sécrétions, comme dans les glandes salivaires. Cependant, le marquage GnRH1 de ces glandes est observé dans tous les spécimens (P6, P11, P15) à l'exception du contrôle.

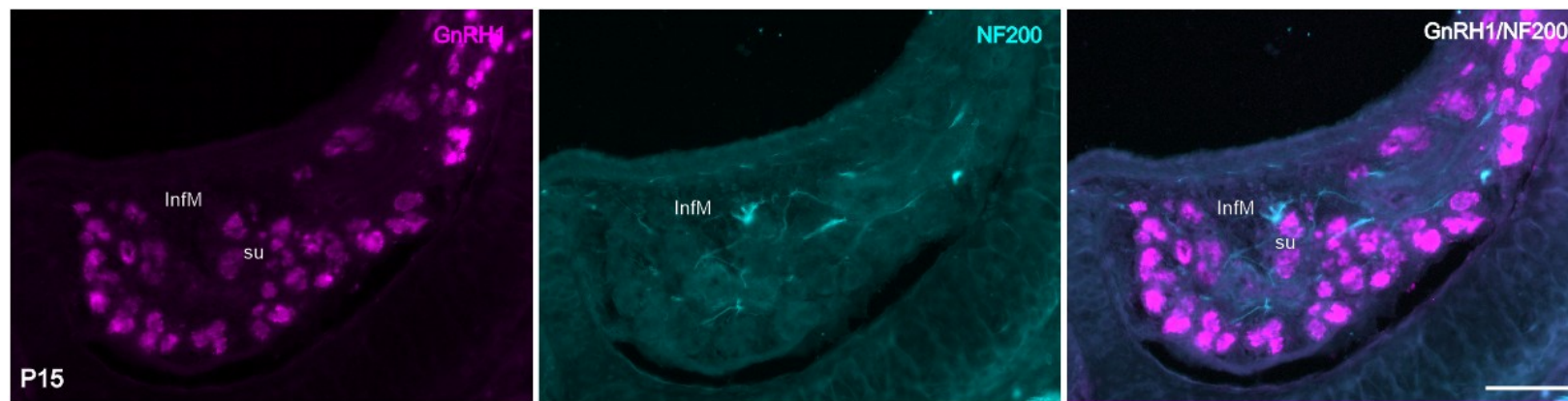


Fig 13. Coupes transverses de la cavité nasale à P15 montrant les glandes exprimant la GnRH1 (magenta) dans le méat inférieur nasal. Des fibres marquées au NF200 (cyan) entourent ces glandes. Dorsal est vers le haut. InfM, méat inférieur nasal; su, unité sécrétoire. Échelle = 100 μ m.

3.5 Régions olfactives

À P0, aucune fibre marquée au NF200 provenant de l'épithélium nasal en général ne converge latéralement aux OB. Il n'y a pas de marquage NF200 dans les régions présomptives du cortex olfactif. À P2, les projections des neurones sensoriels de l'épithélium olfactif exprimant le NF200 se regroupent dans les faisceaux longeant le septum dorsal et la lame criblée, mais ils ne pénètrent pas dans les régions latérales de l'OB. Les VNO sont développés, mais seulement quelques fibres sont associées à ces structures. À P6 et P11, il y a davantage de fibres exprimant NF200 au niveau de la lame criblée, mais elles ne pénètrent toujours pas dans les régions latérales de l'OB (Fig. 14A). À P11, le tractus olfactif latéral est légèrement marqué au NF200 (Fig. 14B). De P2 à P11, aucune fibre marquée au NF200 n'a été observée dans les régions du noyau antérieur olfactif, du taenia tecta, du tubercule olfactif, du complexe amygdalien et du cortex piriforme. Ce n'est qu'à P15 que des fibres NF200, probablement olfactives, apparaissent dans le cortex piriforme (Fig. 15). Le développement ultérieur de ces régions n'a pas été étudié.

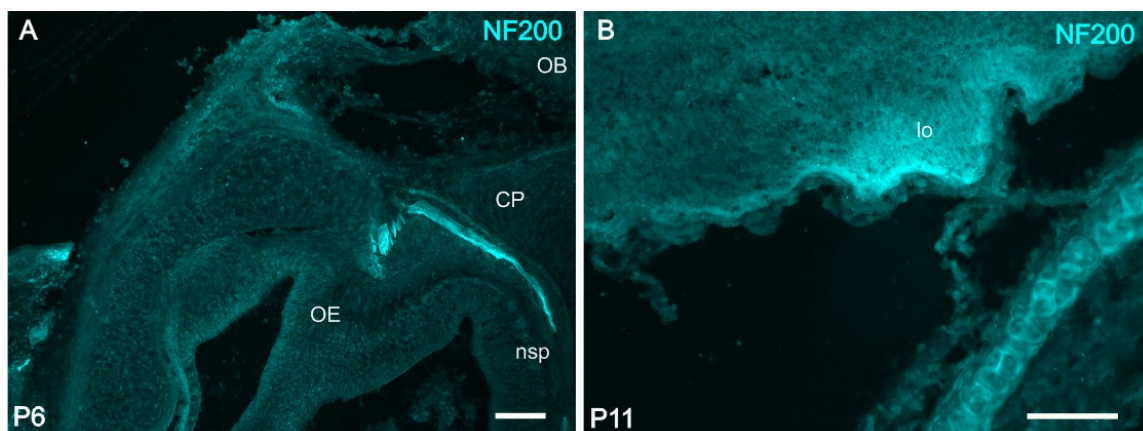


Figure 14. Coupes transverses à P6 (A) et P11 (B) montrant les fibres exprimant le NF200 (cyan) dans les régions olfactives. Dorsal est vers le haut. CP, lame criblée; OB, bulbe olfactif; OE, épithélium olfactif; lo, tractus olfactif latéral; nsp, septum nasal. Échelles = 100 μ m.

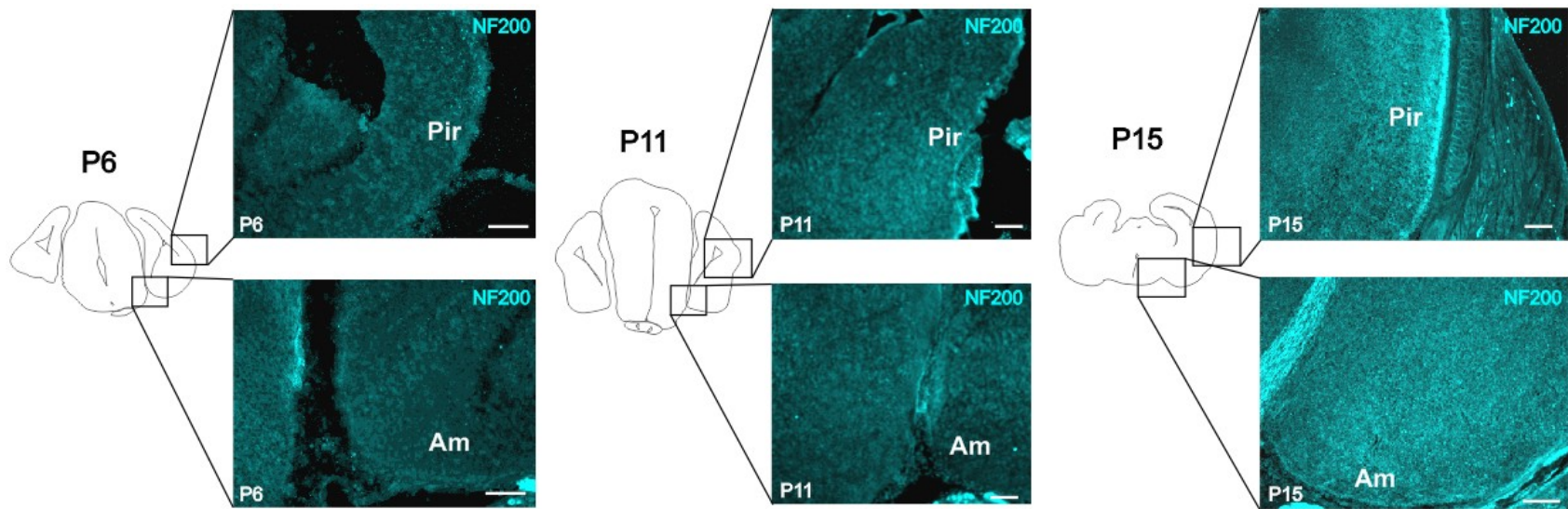


Fig 15. Coupes transverses montrant le marquage NF200 (cyan) dans une portion du cortex olfactif à différents âges (P6, P11, P15). Dorsal est vers le haut. Am, complexe amygdalien; Pir, cortex piriforme. Échelles = 100 μ m.

4. Discussion & conclusion

Le but premier de cette étude était d'étudier le développement du faisceau de fibres nerveuses exprimant les neurofilaments à chaîne lourde (180-200 KDa; NF200), mis en évidence dans une étude précédente chez l'opossum néonatal (Adaja et al., 2013), qui relie les bulbes olfactifs à la lame terminale, notamment pour déterminer si ce faisceau était relié au système olfactif. Le NF200, un filament intermédiaire spécifique à certaines fibres nerveuses, est utilisé comme marqueur de développement, car son expression survient après celle des neurofilaments à chaîne légère et à chaîne moyenne (Szaro & Strong, 2010). Étant donné que les résultats de Adadja et al. (2013) supportaient une immaturité du système olfactif à la naissance chez l'opossum, nous avons comme hypothèse que ce faisceau pourrait être le nerf terminal plutôt que le nerf olfactif. Un moyen de le vérifier était de voir si ce faisceau est associé à la migration des cellules synthétisant la GnRH. La double immunohistochimie contre NF200 et GnRH1 chez les opossums néonataux (entre P0 et P15) a permis de suivre le développement du faisceau ainsi que d'observer la localisation et la distribution des cellules GnRH1 et de leurs projections.

Les résultats du marquage au NF200 aux différents âges indiquent que les efférences précoces reliant le bulbe olfactif (OB) et la lame terminale ne sont pas olfactives. En effet, elles pénètrent dans l'OB par leur portion médiale, continuent médialement dans la lame terminale, descendent vers la bande diagonale de Broca et les régions hypothalamiques présomptives. Ce trajet ne correspond pas à celui des projections olfactives qui, elles, longent plutôt les portions latérales de l'OB pour former les voies olfactives qui cheminent ventrolatéralement pour atteindre le cortex olfactif (Martinez-Marcos & Halpern, 2006; Ubeda-Bañon et al., 2011). Quant au nerf voméronasal, il rentre dans l'OB par sa portion médiale pour remonter dorsalement dans les AOB où il se termine (Meisami & Bhatnagar, 1998; Martinez-Marcos & Halpern, 1999). Enfin, les efférences de l'AOB suivent un trajet ventromédial pour atteindre principalement l'amygdale voméronasale (Salazar & Quinteiro, 2009). Par contre, les fibres marquées au NF200 ne sont pas observées dans les portions dorsales des OB et l'AOB n'est

pas encore distinguable à la naissance chez l'opossum (Schwanzel-Fukuda et al., 1988; observations personnelles).

Les fibres marquées au NF200 correspondent plutôt au nerf terminal. Ce faisceau est étroitement associé aux cellules et fibres exprimant la GnRH, caractéristique souvent utilisée pour l'identifier (Wirsig-Wiechmann et Wiechmann, 2002). De plus, la localisation des fibres exprimant la NF200 correspond à celle du nerf terminal décrit par Schwanzel-Fukuda et al. (1988). Ces fibres sont observées dans la cavité nasale où le nerf terminal posséderait des innervations périphériques (Bojsen-Møller, 1975), passent par le ganglion terminal où sont localisés les corps cellulaires (Zheng et al., 1990), pénètrent médialement dans l'OB et restent à sa surface ventromédiale (Vilensky, 2012). En outre, à P15 le marquage NF200 n'est plus visible dans ces régions, ce qui irait dans le sens de la disparition d'une branche du nerf terminal chez le wallaby vers cet âge (Ashwell et al., 2008).

La maturation très précoce du faisceau, prénatale même chez un marsupial comme l'opossum, et l'expression transitoire du NF200 par les fibres le composant, laissent entrevoir la possibilité que le nerf terminal serve de voie pionnière pour d'autres systèmes neuronaux. Tôt durant le développement, des neurones pionniers établissent un échafaudage axonique qui, par l'expression ou la sécrétion de diverses molécules, en font un substrat favorisant la croissance de fibres nerveuses et la migration neuronale (Raper & Mason, 2010). La majorité des populations de neurones transitoires, qui disparaissent ou se transforment en d'autres types cellulaires lors du développement subséquent, forment ces voies pionnières. Par exemple, la décussation des axones rétino-fuges dans le chiasma optique de souris nécessite un échafaudage en V d'une population transitoire de neurones associée à des cellules gliales radiales spécialisées (Marcus et al., 1995). Ainsi, l'étroite association du faisceau marqué au NF200 aux cellules et fibres exprimant la GnRH1 de P0 à P11 chez l'opossum suggère que ces dernières utilisent le faisceau comme substrat pour migrer vers les régions hypothalamiques. Des expériences de traçage neuronal ou d'immunohistochimie utilisant d'autres marqueurs seraient nécessaires pour

déterminer si le faisceau exprimant NF200 disparaît totalement entre P11 et P15, ou s'il s'agit d'un arrêt de l'expression de ces neurofilaments. Toutefois, la disparition de ce marqueur semble correspondre temporellement à l'arrivée et la distribution des fibres exprimant la GnRH1 au niveau hypothalamique.

Par ailleurs, nous avons aussi observé que des fibres prenant origine dans l'hippocampe présomptif semblent suivre le trajet central du nerf terminal jusqu'au niveau de la commissure antérieure (non illustré). Ces fibres prenant origine dans l'hippocampe présomptif pourraient correspondre à un faisceau de fibres radiaires transitoire autour du foramen interventriculaire chez l'opossum à P5 (Cummings et al., 1996). Cependant, ces auteurs n'ont pu déterminer si ce faisceau était neuronal ou glial. Tout comme pour le faisceau de fibres exprimant le NF200, ce faisceau radiaire est plus épais aux alentours de P7 et établit des prolongements vers la région dorsale du troisième ventricule au niveau de la commissure antérieure. Par contre, Cummings et al. (1996) n'ont plus observé ces prolongements radiaires à P10, une fois que la commissure antérieure est bien établie. À cet âge, le faisceau de fibres exprimant NF200 est toujours présent, mais aucune fibre n'est aperçue traversant la région de la commissure antérieure contrairement aux âges précédents.

L'identité des molécules qui pourraient attirer les fibres positives pour GNRH est inconnue, mais il semble bien que ces fibres suivent celles qui expriment NF200. Nous avons en effet observé une association entre ces deux types de fibres aussi au niveau des voies visuelles, comme si certaines fibres GnRH avaient trouvé un substrat favorisant une croissance ectopique. Cette observation suggère que le substrat sur lequel migrent les neurones GnRH1 et leurs prolongements serait de nature neurale. Toutefois, Cummings et Brunjes (1995) ont utilisé des marqueurs de cellules gliales (S-100 et GFAP) dans la région du nerf terminal pour déterminer si ce dernier pouvait servir de substrat pour la migration des neurones et fibres exprimant la GnRH (ou LHRH) chez l'opossum néonatal. Ces auteurs rapportent une expression du S-100 similaire à celle que nous observons pour le faisceau exprimant le NF200 : VNO, ganglion terminal, lame terminale, organe subfornical et télencéphale ventral.

Cependant, S-100 est présent à tous les âges étudiés dans la couche du nerf olfactif et des cellules marquées au S-100, qui sont possiblement des cellules olfactives engainantes, sont associées aux cellules et fibres exprimant la GnRH tout le long du trajet. De plus, les prolongements exprimant S-100 sont observés à des endroits plus caudaux que le faisceau exprimant NF200, tels que l'éminence médiale et le chiasma optique. Ces prolongements S-100 ne sont cependant pas toujours observés en association avec le GnRH. L'expression du S-100 dans le nerf terminal perdure jusqu'à P20, mais n'est plus présente chez l'adulte. Des expériences sur des explants nasaux de souris ont démontré, d'une part, que les cellules olfactives engainantes sont nécessaires pour la migration des cellules exprimant GnRH1 et, d'autre part, que dans les souris transgéniques GFAP-GFP, il y a un microenvironnement glial associé aux GnRH1 (Geller et al., 2013). Si ces données supportent fortement l'implication de S-100 dans la migration des neurones synthétisant la GnRH (gradient chimiotactique, interaction de surface), nos résultats suggèrent que d'autres facteurs, neuronaux plus que gliaux, pourraient être aussi impliqués. D'ailleurs, chez la souris, les cellules GnRH1 migrent le long des nerfs olfactifs et voméronasaux (Wray, 2002) et plusieurs facteurs pouvant affecter cette migration pointent vers un substrat neural. Par exemple, un dérèglement de la molécule d'adhésion de cellule neurale (PSA-NCAM) durant le développement perturbe la migration de GnRH1 (Schwanzel-Fukuda et al., 1994; Wieman et al., 2011). Une déficience en anosmine, une glycoprotéine de la matrice extracellulaire possédant des motifs similaires aux facteurs de guidage axonique, résulte en un amoncellement de fibres olfactives, voméronasales et terminales au niveau de la lame criblée (Wieman et al., 2011). Finalement, la périphérine, un filament intermédiaire de neurone, est retrouvée tout le long de la route migratoire des GnRH chez la souris embryonnaire (Wray, 2002).

Le nerf terminal se retrouve chez tous les vertébrés, mais sa morphologie et, probablement, ses rôles sont extrêmement variables d'espèce en espèce. Par exemple, les téléostéens et les requins possèdent au moins une branche de nerf terminal anatomiquement séparée du tractus olfactif. Chez ces animaux, les projections périphériques du nerf terminal se distribuent dans l'épithélium olfactif,

comme c'est le cas pour les mammifères, mais également dans la rétine et le nerf optique (Stell et al., 1984; Grober et al., 1987). L'innervation centrale est très étendue : régions télencéphaliques et diencephaliques ventrales (comme chez les mammifères), régions mésencéphaliques (tegmentum mésencéphalique, tores semicirculaires et tectum optique) et d'autres portions du tronc cérébral (Oka, 1992; Oka & Matsuhima, 1993).

Même au sein des mammifères, des différences existent dans l'importance du nerf terminal. Pour reprendre un exemple mentionné précédemment (section 1.3), le nerf terminal des rongeurs adultes est difficilement discernable des fibres voméronasales et olfactives (Wray, 2010) alors que l'opossum possède un nerf terminal distinct de ces dernières (Schwanzel-Fukuda et al., 1988).

Les différences pourraient se refléter au niveau développemental. En effet, la migration des neurones GnRH semble légèrement différente chez les rongeurs et l'opossum. Chez la souris, les neurones GnRH sont identifiables à partir de E9 et migrent dans le cerveau antérieur le long d'un mélange de fibres voméronasales et olfactives (Tobet et al., 1992; Wray, 2010; Wiernan et al., 2011). À E11, âge approximativement comparable à celui de la naissance (P0) chez l'opossum, le nerf voméronasal commence à se former puis se divise en deux branches: branche dorsale qui se dirige vers l'AOB et une plus petite branche caudale qui s'étend vers le cerveau antérieur (le nerf terminal). Vers E11.5, les neurones exprimant GnRH1 commencent à migrer du VNO le long du nerf voméronasal, puis elles pénètrent dans les bulbes olfactifs et empruntent une voie ventrale, le long du OB, pour atteindre les régions préoptiques (Wray, 2010; Geller et al., 2013). Par contraste, chez l'opossum à P0, l'AOB n'est pas encore présent et les fibres voméronasales n'expriment pas encore le NF200; les fibres et cellules GnRH empruntent un chemin plus médial et dorsal pour atteindre les régions hypothalamiques (nos résultats; Schwanzel-Fukuda et al., 1988).

En lien avec ce dernier point, une observation intrigante est la présence de GnRH1 dans des glandes du méat inférieur nasal que nous avons observée chez l'opossum à partir de P5. Une étude plus approfondie serait nécessaire pour vérifier le développement ultérieur de cette expression ainsi que pour identifier la source de l'innervation mise en relief par le marquage NF200 dans cette région. Une telle étude aiderait à mieux comprendre le rôle de ces glandes, car à notre connaissance, la seule référence à la présence de GnRH dans des glandes nasales concerne des terminaisons en « paniers » exprimant la GnRH à proximité des acini glandulaires et des canaux excréteurs des glandes antérieures médiales (glandes présentes chez le rat et la souris) (Zheng et al., 1988; Kerjaschki, 1974).

Cummings et Brunjes (1995) ont observé que les fibres olfactives du nouveau-né d'opossum faisaient contact avec les OB et que la présence du S-100b et de GFAP dans le nerf olfactif indiquerait que les cellules engainantes seraient assez différenciées durant la période postnatale pour être aptes à guider les nerfs vers leurs cibles appropriées. Il y aurait donc une possibilité que, malgré l'immaturité morphologique des OB, un certain nombre de neurones olfactifs soient assez matures pour être fonctionnels. Par contre, nos résultats montrent qu'aucune fibre exprimant le NF200 ne pénètre dans les régions latérales de l'OB à la naissance, et le tractus olfactif latéral n'est que faiblement marqué au NF200 à P11. Il a été montré que la formation de synapses entre afférences olfactives et cellules mitrales ne débute pas avant la deuxième semaine postnatale (Chuah et al., 1997), l'apparition tardive de NF200 pourrait donc refléter le peu d'afférences matures dans le tractus olfactif latéral. Concernant les projections secondaires, centrales, la croissance des axones des cellules mitrales débute vers P3 alors que celle des cellules à panache commence vers P15 (Malun & Brunjes, 1996). Dans notre étude, chez des animaux âgés de P0 à P15, aucune fibre positive pour NF200 n'a été observée dans les voies olfactives ou les régions cibles des projections olfactives (noyau antérieur olfactif, taenia tecta, tubercule olfactif, complexe amygdalien, cortex piriforme). Ce n'est qu'à P15 que quelques fibres marquées au NF200 sont observées dans le cortex piriforme. L'absence de fibres exprimant NF200, et donc de fibres relativement matures, dans le

cortex olfactif avant P15 supporte l'idée que le système olfactif est trop immature pour influencer la locomotion chez le nouveau-né d'opossum par les voies habituelles (Adadja et al., 2010). De plus, ces résultats concordent avec des observations anatomiques effectuées chez une autre espèce marsupiale, le wallaby, qui démontrent un lent développement postnatal du système olfactif (Ashwell et al., 2008).

Se basant sur des observations comportementales et anatomiques, certains chercheurs ont suggéré que le système olfactif était fonctionnel dès la naissance chez le wallaby (Schneider et al., 2009) et l'opossum à queue en brosse (Veitch et al., 2000). Toutefois, les observations anatomiques pointent vers une certaine maturité de l'épithélium et du bulbe olfactif sans permettre d'inférence véritable quant à la fonctionnalité des relais olfactifs centraux (contrairement à Ashwell et al., 2008). Les observations comportementales supportent bien une perception chimiosensorielle, mais cette dernière pourrait dépendre d'autres systèmes sensoriels, notamment le système du trijumeau (sensibilité de la peau faciale; Adadja et al., 2010, Desmarais et al., 2016) ou le système gustatif. À notre connaissance, aucune étude fonctionnelle du goût n'a été entreprise chez les marsupiaux nouveau-nés, ce qui serait la seule manière d'éliminer l'hypothèse que ce système puisse influencer les comportements moteurs précoces.

En bref, nos résultats suggèrent que le faisceau exprimant le NF200 n'est pas relié au système olfactif, mais fait partie du nerf terminal. L'absence d'expression NF200 dans ce faisceau à P15 laisse penser que ce faisceau pourrait être une voie pionnière par laquelle les cellules et les fibres exprimant la GnRH1 puissent migrer de l'épithélium olfactif vers les régions hypothalamiques. Ce serait sur une voie neurale plutôt que gliale que la migration des cellules GnRH1 se ferait. Le nerf terminal est très variable d'espèce en espèce, ce qui explique les différences observées entre les rongeurs et l'opossum. Mes hypothèses de départ ont donc été confirmées : les fibres marquées au NF200 sont associées à la migration des cellules synthétisant le GnRH1 et appartiennent au système du nerf terminal. Quant au système olfactif, nous pouvons affirmer qu'il est trop immature à la naissance pour être fonctionnel. Par conséquent, il

ne peut donc pas guider les nouveau-nés de l'orifice urogénital jusqu'à la tétine de la mère.

Bibliographie

Adadja T, Cabana T, Pflieger J. (2013). Cephalic sensory influence on forelimb movement in newborn opossums, *Monodelphis domestica*. Neuroscience 228: 259-70.

Altman J, Bayer SA. (1995). Atlas of Prenatal Rat Brain Development. Boca Raton: CRC Press. 661 pp.

Ashwell KW, Marotte LR, Cheng G. (2008). Development of the olfactory system in a wallaby (*Macropus eugenii*). Brain, Behaviour and Evolution 71: 216-30.

Barthélemy D, Cabana T. (2005). Postnatal development of limb motor innervation in the opossum *Monodelphis domestica*: Immunohistochemical localization of acetylcholine. Developmental Brain Research 155: 87-98.

Bayer SA, Altman J. (2004). Development of the telencephalon: Neural stem cells, neurogenesis and neuronal migration. In: Paxinos G, editor. The Rat Nervous Systems. 3rd edition. San Diego: Academic Press. pp. 27–73.

Bojsen-Møller F. (1975). Demonstration of Terminalis, Olfactory, Trigeminal and Perivascular Nerves in the Rat Nasal Septum. Journal of Comparative Neurology 159: 245–56.

Brunjes P, Jazaeri A, Sutherland M. (1992). Olfactory Bulb Organization and Development in *Monodelphis domestica* (grey short-tailed opossum). The Journal of Comparative Neurology 320: 544-54.

Cabana T. (2000). The Development of Mammalian Motor Systems: The Opossum *Monodelphis Domestica* as a Model. Brain Research Bulletin 53: 615–26.

Cassidy G, Boudrias D, Pflieger JF, Cabana T. (1994). The development of sensorimotor reflexes in the Brazilian opossum *Monodelphis domestica*. Brain, Behavior and Evolution 43: 243-25.

Canavan SV, Mayes LC, Treloar HB. (2011). Changes in Maternal Gene Expression in Olfactory Circuits in the Immediate Postpartum Period. Frontiers in Psychiatry 2: 40.

Chuah MI, Tennent R, Teague R. (1997). Developmental Anatomy of the Primary Olfactory Pathway in the Opossum *Monodelphis Domestica*. Histology and Histopathology 12: 799–806.

Cullen KE. (2012). The vestibular system: multimodal integration and encoding of self-motion for motor control. Trends in Neurosciences 35: 185-196.

Cummings DM, Brunjes PC. (1995). Migrating Luteinizing Hormone-Releasing Hormone (LHRH) Neurons and Processes Are Associated with a Substrate That Expresses S100. *Brain Research. Developmental Brain Research* 88: 148–57.

Desmarais MJ. (2015). Influence de la mécanoréception faciale sur les comportements moteurs chez l'opossum nouveau-né, *Monodelphis domestica*. Mémoire de maîtrise, Université de Montréal. <https://papyrus.bib.umontreal.ca/xmlui/handle/1866/12582>

Desmarais MJ, Beauregard F, Pflieger JF. (2016). Facial Mechanosensory Influence on Forelimb Movement in Newborn Opossums, *Monodelphis domestica*. *PLoS ONE* 11: e0148352.

Ellendorff F, Tyndale-Biscoe CH, Mark RF. (1988). Ontogenetic changes in olfactory bulb neural activities of pouched young tammar wallabies. In: Künzel W, Jensen A, editors. *The Endocrine Control of the Fetus*. Berlin: Springer-Verlag. pp. 193–200.

Fadem BH, Trupin GL, Maliniak E, VandeBerg JL, Hayssen V. (1982). Care and Breeding of the Gray, Short-Tailed Opossum (*Monodelphis domestica*). *Laboratory Animal Science* 32: 405-9.

Geller S, Kolasa E, Tillet Y, Duittoz A, Vaudin P. (2013). Olfactory Ensheathing Cells Form the Microenvironment of Migrating GnRH-1 Neurons during Mouse Development. *Glia* 61: 550–66.

Gemmell RT, Nelson J. (1988). Ultrastructure of the Olfactory System of Three Newborn Marsupial Species. *The Anatomical Record* 221: 655–62.

Gemmell RT, Rose RW. (1989). The Senses Involved in Movement of Some Newborn Macropodoidea and Other Marsupials from Cloaca to Pouch. In: Grigg G, Jarman P, Hume I, editors. *Kangaroo, Wallabies and Rat Kangaroos*. Sydney: Surrey Beatty & Sons Pty. Ltd. pp. 339–47.

Go JL, Kim PE, Zee CS. (2001). The trigeminal nerve. *Seminars in Ultrasound, CT and MRI*. 22: 502-520.

Goldberg ME, Walker MF, Hudspeth AJ. (2013). The Vestibular System. In: Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM, Siegelbaum SA, Hudspeth AJ, editors. *Principles of neural science*. 5th edition. McGraw-Hill: New York. pp. 917-934.

Grober MS, Bass AH, Burd G, Marchaterre MA, Segil N, Scholz K, Hodgson, T. (1987) The nervus terminalis ganglion in *Anguilla tostrata*: an immunocytochemical and HRP histochemical analysis. *Brain Research* 436: 148-152.

Halpern M, Daniels Y, Zuri I. (2005). The role of the vomeronasal system in food preferences of the gray short-tailed opossum, *Monodelphis domestica*. *Nutrition & Metabolism* 2: 6.

Harding J.W., Getchell T.V. and Margolis F.L. (1978). Denervation of the primary olfactory pathway in mice. V. Long-term effect of intranasal SO₄ irrigation on behavior, biochemistry, and morphology. *Brain Research* 140: 271-285.

Jennes L. (1987). The Nervus Terminalis in the Mouse: Light and Electron Microscopic Immunocytochemical Studies. *Annals New York Academy of Sciences* 519: 165-73.

Kawamura K, Kikuyama S. (1998). Developmental Origin of the Olfactory System and GnRH Neurons in the Amphibia. *Annals of the New York Academy of Sciences* 839: 201-4.

Kerjaschki D. (1974). The Anterior Medial Gland in the Mouse Nasal Septum: An Uncommon Type of Epithelium with Abundant Innervation. *Journal of Ultrastructure Research* 46: 466-82.

King JA, Hinds LA, Mehl AEI, Saunders NR, Millar RP. (1990). Chicken GnRH II Occurs Together With Mammalian GnRH in a South American Species of Marsupial (*Monodelphis Domestica*). *Peptides* 11: 521-25.

Kosaka K, Kosaka T. (2005). Synaptic organization of the glomerulus in the main olfactory bulb: compartments of the glomerulus and heterogeneity of the periglomerular cells. *Anatomical science international* 80: 80-90.

Kratzing J. (1986). Morphological Maturation of the Olfactory Epithelia of Australian Marsupials. In: Breipohl W, Apfelbach R. *Ontogeny of Olfaction : Principles of Olfactory Maturation in Vertebrates*. Berlin: Springer-Verlag Berlin Heidelberg. p. 57-70.

Kraus DB, Fadem BH. (1987). Reproduction, development and physiology of the gray short-tailed opossum (*Monodelphis domestica*). *Laboratory Animal Science* 37: 478-482.

Lavallée A, Pflieger JF. (2009). Developmental expression of spontaneous activity in the spinal cord of postnatal opossums, *Monodelphis domestica*: An anatomical study. *Brain Research* 1282: 1-9.

Lehman MN, Newman SW, Silverman A-J. (1987). Luteinizing Hormone-Releasing Hormone in the Vomeronasal System and Terminal Nerve of the Hamster. *Annals of the New York Academy of Sciences* 519: 229-40.

Ma M. (2010). Multiple Olfactory Subsystems Convey Various Sensory Signals. In: Menini A, editor. *The Neurobiology of Olfaction*. Boca Raton: CRC Press. pp. 225-241.

Macrides F, Schoenfeld TA, Clancy AN, Kumar MS., Kream RM. (1987). Hormones and Neurotransmitters in the Mammalian Olfactory System. *Annals of the New York Academy of Sciences* 519: 150–64.

Malun D, Brunjes PC. (1996). Development of olfactory glomeruli: temporal and spatial interactions between olfactory receptor axons and mitral cells in opossums and rats. *Journal of Comparative Neurology* 368: 1–16.

Marchand R, Bélanger MC. (1991). Ontogenesis of the axonal circuitry associated with the olfactory system of the rat embryo. *Neuroscience Letters* 129: 285–290.

Marcus RC, Blazeski R, Godement P, Mason CA. (1995). Retinal axon divergence in the optic chiasm: Uncrossed axons diverge from crossed axons within a midline glial specialization. *Journal of Neuroscience* 15: 3716-3729.

Martínez-Marcos A, Halpern M. (1999). Differential projections from the anterior and posterior divisions of the accessory olfactory bulb to the medial amygdala in the opossum, *Monodelphis domestica*. *European Journal of Neuroscience* 11: 3789-99.

Martínez-Marcos A, Halpern M. (2006). Efferent connections of the main olfactory bulb in the opossum (*Monodelphis domestica*): A characterization of the olfactory entorhinal cortex in a marsupial. *Neuroscience Letters* 395: 51-56.

Martin KEA, MacKay S. (2003). Postnatal development of the fore-and hindlimbs in the grey short-tailed opossum, *Monodelphis domestica*. *Journal of Anatomy* 202: 143-152.

Math F, Davrainville JL. (1980). Electrophysiological study on the postnatal development of mitral cell activity in the rat olfactory bulb. *Brain Research* 190: 243–247.

McAllan BM. (2010). Reproductive Endocrinology of Prototherians and Metatherians. In: Norris DO, Lopez KH, editors. *Hormones and Reproduction of Vertebrate, Mammals*. San Diego: Academic Press. pp.195-214.

McCotter RE. (1912). The Connection of the Vomeronasal Nerves with the Accessory Olfactory Bulb in the Opossum and Other Mammals. *The Anatomical Record* 6: 299–318.

Meisami E, Bhatnagar K. (1998). Structure and diversity in mammalian accessory olfactory bulb. *Microscopy Research and Technique* 43: 476-99.

Oka, Y. (1992). Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) cells of the terminal nerve as a model neuromodulator system. *Neuroscience Letters* 142: 119–122.

Oka, Y, Matsushima T. (1993). Gonadotropin-releasing hormone (GnRH)-immunoreactive terminal nerve cells have intrinsic rhythmicity and project widely in the brain. *Journal of Neuroscience* 13: 2161-2176.

Parhar IS. (2002). Cell Migration and Evolutionary Significance of GnRH Subtype. *Progress in Brain Research* 141: 3–17.

Parhar IS, Soga T, Ishikawa Y, Nagahama Y, Sakuma Y. (1998). Neurons Synthesizing Gonadotropin-Releasing Hormone mRNA Sub-Types Have Multiple Developmental Origins in the Medaka. *Journal of Comparative Neurology* 401: 217–26.

Paxinos G, Ashwell KWS, Tork I. (1994). *Atlas of the Developing Rat Nervous System*. 2nd edition. San Diego: Academic Press. 438 p.

Pedersen PE, Stewart WB, Greer CA, Shepherd GM. (1983). Evidence for Olfactory Function in Utero. *Science* 221: 478-480.

Pflieger JF, Cabana T. (1996). The vestibular primary afferents and the vestibulospinal projections in the developing and adult opossum, *Monodelphis domestica*. *Anatomy and Embryology* 194: 75-88.

Pflieger JF, Cassidy G, Cabana T. (1996). Development of spontaneous locomotor behaviors in the opossum, *Monodelphis domestica*. *Behavioural Brain Research* 80: 137-143.

Pundir AS, Hameed LS, Dikshit PC, Kumar P, Mohan S, Radotra B, Shankar SK, Mahadevan A, Iyengar S. (2012). Expression of Medium and Heavy Chain Neurofilaments in the Developing Human Auditory Cortex. *Brain Structure & Function* 217: 303–21.

Raper J, Mason C. (2010). Cellular Strategies of Axonal Pathfinding. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2: a001933.

Reimer K. (1996). Ontogeny of hearing in the marsupial, *Monodelphis domestica*, as revealed by brainstem auditory evoked potentials. *Hearing Research* 92: 143-150.

Salazar I, Quinteiro PS. (2009). The Risk of Extrapolation in Neuroanatomy: The Case of the Mammalian Vomeronasal System. *Frontiers in Neuroanatomy* 3: 22.

Santacana M, Heredia M, Valverde F (1992) Development of the main efferent cells of the anterior olfactory bulb and of the bulbar component of the anterior commissure. *Developmental Brain Research* 65: 75–83.

Saper CB, Lumsden AGS, Richerson GB. (2013). The Sensory, Motor, and Reflex Functions of the Brain Stem. In: Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM, Siegelbaum SA, Hudspeth AJ. Principles of neural science. 5th edition. New York: McGraw-Hill. p 1019-1037.

Schaal B. (2010). Mammary Odor Cues and Pheromones: Mammalian Infant-Directed Communication About Maternal State, Mammary, And Milk. *Vitamins and Hormones: Pheromones* 83: 83-136.

Schaal B, Orgeur P. (1992). Olfaction in Utero: Can the Rodent Model be Generalized?. *The Quarterly Journal of Experimental Psychology* 44B: 245-278.

Schneider NY, Fletcher TP, Shaw G, Renfree MB. (2009). The Olfactory System of the Tammar Wallaby Is Developed at Birth and Directs the Neonate to Its Mother's Pouch Odours. *Reproduction* 138: 849–57.

Schneider NY. (2011). The development of the olfactory organs in newly hatched monotremes and neonate marsupials. *Journal of Anatomy* 219:229-42.

Schwanzel-Fukuda M, Silverman J. (1980). The Nervus Terminalis of the Guinea Pig: A New Luteinizing Hormone-Releasing Hormone (LHRH) Neuronal System. *The Journal of Comparative Neurology* 191: 213–25.

Schwanzel-Fukuda M, Morrell JI, Pfaff DW. (1985). Ontogenesis of Neurons Producing Luteinizing Hormone-Releasing Hormone (LHRH) in the Nervus Terminalis of the Rat. *The Journal of Comparative Neurology* 238: 348–64.

Schwanzel-Fukuda M, Fadem BH, Garcia MS, Pfaff DW. (1988). Immunocytochemical Localization of Luteinizing Hormone-Releasing Hormone (LHRH) in the Brain and Nervus Terminalis of the Adult and Early Neonatal Gray Short-Tailed Opossum (*Monodelphis domestica*). *The Journal of Comparative Neurology* 276: 44–60.

Schwanzel-Fukuda M, Reinhard, GR, Abraham S, Crossin KL, Edelman GM, Pfaff DW. (1994). Antibody to neural cell adhesion molecule can disrupt the migration of luteinizing hormone-releasing hormone neurons into the mouse brain. *Journal of Comparative Neurology* 342: 174-185.

Seeburg PH, Mason A, Stewart T, Nikolics K. (1987). The Mammalian GnRH Gene and Its Pivotal Role in Reproduction. *Recent Progress in Hormone Research* 43: 69–98.

Sharman GB. (1973). Adaptations of marsupial pouch young for extrauterine existence. In: Austin CR, editor. *The mammalian fetus in vitro*. London: Chapman and Hall. pp. 67-90.

Smith KK. (2001). Early development of the neural plate, neural crest and facial region of marsupials. *Journal of Anatomy* 199: 121-31.

Stell WK, Walker SE, Chohan KS, Ball AK. (1984). The goldfish nervus terminalis: a luteinizing hormone- releasing hormone and molluscan cardioexcitatory peptide immunoreactive olfactoretinal pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 81: 940-944.

Szaro B, Strong M. (2010). Post-Transcriptional Control of Neurofilaments: New Roles in Development, Regeneration and Neurodegenerative Disease. *Trends in Neuroscience* 33: 27–37.

Tarozzo G, Peretto P, Biffo S, Varga Z, Nicholls JG, Fasolo A. (1995). Development and Migration of Olfactory Neurones in the Nervous System of the Neonatal Opossum. *Proceedings. Biological Sciences of the Royal Society* 262: 95–101.

Taylor JS, Guillery RW. (1994). Early development of the optic chiasm in the gray short-tailed opossum, *Monodelphis domestica*. *Journal of Comparative Neurology* 350: 109-121.

Tenne-Brown J, Key B (1999) Errors in lamina growth of primary olfactory axons in the rat and mouse olfactory bulb. *Journal of Comparative Neurology* 410: 20–30.

Tobet SA, Crandall JE, Schwarting GA. (1992). Relationship of Migrating Luteinizing Hormone-Releasing Hormone Neurons to Unique Olfactory System Glycoconjugates in Embryonic Rats. *Developmental Biology* 155: 471–82.

Treloar HB, Purcell AL, Greer CA. (1999). Glomerular formation in the developing rat olfactory bulb. *Journal of Comparative Neurology* 413: 289–304.

Tyndale-Biscoe H. (2005). *Life of Marsupials*. Collingwood: Csiro Publishing. 442 p.

Ubeda-Bañón I, Sistiaga A, Mohedano-Moriano A, Saiz-Sanchez D, De la Rosa-Prieto C, Gutierrez-Castellanos N, Lanuza, E, Martinez-Garcia F, Martinez-Marcos A. (2011). Cladistic analysis of olfactory and vomeronasal systems. *Frontiers in Neuroanatomy* 5: 1-14.

Uchino Y, Kushiro K. (2011). Differences between otolith- and semicircular canal-activated neural circuitry in the vestibular system. *Neuroscience Research* 71: 315-327.

Valverde F, Heredia M, Santacana M. (1993). Characterization of neuronal cell varieties migrating from the olfactory epithelium during prenatal development in the rat. Immunocytochemical study using antibodies against olfactory marker protein (OMP) and luteinizing hormone-releasing hormone (LH-RH). *Brain Research. Developmental brain research* 71: 209-20.

Valverde F, Santacana M, Heredia M. (1992). Formation of an olfactory glomerulus: morphological aspects of development and organization. *Neurosciences* 49: 255-75.

VandeBerg J.L., Williams-languero S. (2010). The laboratory opossum. In: Hubrecht R, Kirkwood J, editors: *The UFAW Handbook on the Care and Management of Laboratory and Other Research Animals*. 8th Edition. Wiley-Blackwell. pp. 247-261.

Veitch CE, Nelson J, Gemmel RT. (2000). Birth in the Brushtail Possum, *Trichosurus vulpecula* (Marsupialia: Phalangeridae). *Australian Journal of Zoology* 48: 691–700.

Vilensky J. (2012). The Neglected Cranial Nerve : Nervus Terminalis (Cranial Nerve N). *Clinical anatomy*

Vinay L, Cazalets JR, Clarac F. (1995). Evidence for the existence of a functional polysynaptic pathway from trigeminal afferents to lumbar motoneurons in the neonatal rat. *European Journal of Neuroscience* 7: 143-51.

Wang XM, Xu XM, Qin YQ, Martin GF. (1992). The origins of supraspinal projections to the cervical and lumbar spinal cord at different stages of development in the gray short-tailed Brazilian opossum, *Monodelphis domestica*. *Developmental Brain Research* 68: 203-216.

Whitlock KE. (2004). Development of the nervus terminalis: origin and migration. *Microscopy Research and Technique* 65: 2–12.

Whitlock KE. (2005). Origin and Development of GnRH Neurons. *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM* 16: 145–51.

Wiernan ME, Kiseljak-Vassiliades K, Tobet S. (2011). Gonadotropin Releasing Hormone (GnRH) Neuron Migration: Initiation, Maintenance and Cessation as Critical Steps to Ensure Normal Reproductive Function. *Frontiers in Neuroendocrinology* 32: 43–52.

Wirsig C, Leonard CM. (1986). Acetylcholinesterase and luteinizing hormone-releasing hormone distinguish separate populations of terminal nerve neurons. 19: 719-740.

Wirsig-Wiechmann C. (2001). Function of gonadotropin-releasing hormone in olfaction. *The Keio Journal of Medicine* 50: 81-85.

Wirsig-Wiechmann C, Lepri J. (1991). LHRH-immunoreactive neurons in the pterygopalatine ganglia of voles: a component of the nervus terminalis. 568: 289-293.

Wirsig-Wiechmann C, Wiechmann HE. (2002). What defines the nervus terminalis? Neurochemical, developmental, and anatomical criteria. *Progress in Brain Research* 141: 45-58.

Wray S. (2002). Development of gonadotropin-releasing hormone-1 neurons. *Frontiers in Neuroendocrinology* 23: 292-316.

Wray S. (2010). From Nose to Brain: Development of Gonadotrophin-Releasing Hormone-1 Neurones. *Journal of Neuroendocrinology* 22: 743–753.

Zheng LM, Caldani M, Jourdan F. (1988). Immunocytochemical Identification of Luteinizing Hormone-Releasing Hormone-Positive Fibres and Terminals in the Olfactory System of the Rat. *Neuroscience* 24: 567–578.

Zheng LM, Pfaff DW, Schwanzel-Fukuda M. (1990). Synaptology of Luteinizing Hormone-Releasing Hormone (LHRH)-Immunoreactive Cells in the Nervus Terminalis of the Gray Short-Tailed Opossum (*Monodelphis Domestica*). *The Journal of Comparative Neurology* 295: 327–337.